

ZELLULÄRE PROTEINE KULTIVierter,
HUMANER FIBROBLASTEN -
SUCHE NACH GESCHLECHTS-
SPEZIFISCHEN UNTERSCHIEDEN
MIT DER ZWEIDIMENSIONALEN
GELELEKTROPHORESE

Sabine Klösser-Zieglmayer



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0042

**ZELLULÄRE PROTEINE KULTIVierter, HUMANER FIBROBLASTEN -
SUCHE NACH GESCHLECHTSSPEZIFISCHEN UNTERSCHIEDEN
MIT DER ZWEIDIMENSIONALEN GELELEKTROPHORESE**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von
Sabine Klösser - Zieglmayer
aus München
September 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

2. Berichterstatter: Dr. rer. nat. habil., Dr. med. L. Gürtler

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 11. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Geschlechtsspezifität der Zelle	1
1.1.1. Definition des H-Y Antigens	1
1.1.2. Genetik des H-Y Antigens	4
1.1.3. Funktion des H-Y Antigens	6
1.1.4. Biochemische Natur des H-Y Antigens	7
1.1.5. Weitere geschlechtsspezifische Strukturen	8
1.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese	9
1.2.1. Zytologie	10
1.2.2. Genetik	12
1.3. Ziel der Untersuchungen	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Zellkultur	16
2.1.1. Zellen	16
2.1.2. Kulturmedien	16
2.1.3. Kulturbedingungen	16
2.1.4. Zellaufbewahrung	17
2.1.5. Radioaktive Markierung	17
2.2. Zellklonierung	18
2.3. Chromosomenanalyse	19
2.3.1. Nachweis des Y-Chromosoms	19
2.3.2. Karyogramm	19
2.4. Zellpräparation zur 2D-Analyse	20
2.4.1. Unfraktioniertes Zellmaterial	20
2.4.2. Tritonlösliche und zytoskeletale Proteine	20
2.5. 2D-Gelelektrophorese	21
2.5.1. Lösungen	21
2.5.2. Erste Dimension	22
2.5.3. Zweite Dimension	22
2.5.4. Bestimmung von isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht	23

2.6.	Auswertung der 2D-Analyse	24
2.6.1.	Fluorogramme	24
2.6.2.	Silberfärbung	24
2.6.3.	Vergleich der 2D-Proteinmuster	25
2.7.	Immunpräzipitation	26
2.7.1.	Lymphozytenaufbereitung	26
2.7.2.	H-Y Antiseren	26
2.7.3.	Immunadsorptionschromatographie	27
2.7.4.	1D-Gelelektrophorese	27
3.	ERGEBNISSE	29
3.1.	Zellkultur	29
3.1.1.	Wachstum der Fibroblasten	29
3.1.2.	Ernte der Fibroblasten	30
3.2.	Darstellung des unfractionierten Zellmaterials	31
3.2.1.	Autoradiographie	31
3.2.2.	Reproduzierbarkeit der Proteinmuster	33
3.2.3.	Silberfärbung	34
3.2.4.	Vergleich der 2D-Muster nach Autoradiographie und Silberfärbung	36
3.3.	Darstellung der Zellfraktionen	38
3.3.1.	Tritonlösliche Proteine	39
3.3.2.	Zytoskeletale Proteine	40
3.3.3.	Reproduzierbarkeit der Proteinmuster	41
3.4.	Vergleich von unfractioniertem Zellmaterial und Zellfraktionen	43
3.5.	2D-Muster von Fibroblasten mit unterschiedlichem Gonosomentyp	45
3.5.1.	Charakterisierung der Zelllinien und zytogenetische Kontrolle	45
3.5.2.	Autoradiographische 2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials	49
3.5.2.1.	Individuelle Unterschiede	52
3.5.2.2.	Geschlechtsspezifische Unterschiede	52
3.5.2.3.	Gewebspezifische Unterschiede	53
3.5.2.4.	Unterschiede bei gonosomal aberranten Zelllinien	53
3.5.3.	2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials nach Silberfärbung	57

3.5.4.	Autoradiographische 2D-Muster der tritonlöslichen Proteine	59
3.5.4.1.	Individuelle Unterschiede	59
3.5.4.2.	Geschlechtsspezifische Unterschiede	62
3.5.4.3.	Gewebsspezifische Unterschiede	62
3.5.4.4.	Unterschiede bei gonosomal aberranten Zelllinien	64
3.6.	Analyse klonierter Fibroblasten-Zelllinien von Patienten mit Mosaik-Karyotypen für gonosomale Aberrationen	67
3.6.1.	Zytogenetische Kontrolle	67
3.6.2.	Reproduzierbarkeit der Proteinmuster	69
3.6.3.	Klone der Mosaik-Zelllinie F87 (46,xx/47,xy/48,xyy)	70
3.6.3.1.	2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials	70
3.6.3.2.	2D-Muster der tritonlöslichen Proteine	73
3.6.4.	Klone der Mosaik-Zelllinie F85 (46,xy/45,xo)	76
3.6.4.1.	2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials	76
3.6.4.2.	2D-Muster der tritonlöslichen Proteine	78
3.6.5.	Zusammenfassung der Varianten bei klonierten Zelllinien	80
3.7.	Zusammenfassende Betrachtung der Varianten bei unklonierten und klonierten Zelllinien	82
3.8.	Ergebnisse der Immunpräzipitation	86
3.8.1.	Polyklonale H-Y Antiseren	87
3.8.2.	"Monoklonale H-Y Antiseren"	89
4.	DISKUSSION	91
4.1.	Proteinmuster der Zellpräparationen	91
4.2.	Zelllinien - spezifische Varianten	93
4.3.	Gonosomal aberrante Zelllinien	96
4.4.	Klonierte Zelllinien	98
4.5.	Geschlechtsspezifische Unterschiede	100
5.	ZUSAMMENFASSUNG	103
	LITERATURVERZEICHNIS	105
	ABKÜRZUNGEN	117
	DANKSAGUNG	118
	LEBENS LAUF	119

I. EINLEITUNG

I.1. GESCHLECHTSSPEZIFITÄT DER ZELLE

Erste Hinweise für geschlechtsspezifische Zelloberflächen-Strukturen brachte eine Publikation von Eichwald und Silmsen aus dem Jahre 1955: Bei Hauttransplantationen zwischen weiblichen und männlichen Mäusen eines Inzuchtstammes wurden die Transplantate von weiblichen Mäusen auf weibliche, von männlichen auf männliche und von weibliche auf männliche Mäuse akzeptiert. Transplantate von männlichen auf weibliche Mäuse jedoch wurden entgegen den Erwartungen abgestoßen.

In der Folge wurde dieses Ergebnis durch Transplantationen von Haut (Eichwald et al., 1958; Sachs und Heller, 1958; Hauschka et al., 1959; Mariani et al., 1960; Bailey, 1971; Gasser und Silvers, 1971; Stimpfling und Reichert, 1971; Hurme et al. 1978) und Niere (DeMott-Friberg, 1979) bei den unterschiedlichsten Maus-Inzuchtstämmen bestätigt. Das gleiche Phänomen zeigten Hauttransplantationen bei Ratten-Inzuchtstämmen (Zeiss et al., 1962; Silvers et al., 1977; Billingham und Silvers, 1959).

Entgegen den Gesetzen der Transplantation, nach denen innerhalb eines Inzuchtstammes, also zwischen genetisch identischen Individuen, Transplantate grundsätzlich akzeptiert werden (Snell, 1953) erkennen weibliche Mäuse auf männliche Zellen eine fremde Struktur, die zur Transplantatabstoßung führt. Von Billingham und Silvers zum ersten Mal als H-Y Antigen bezeichnet (Billingham und Silvers, 1960) ist diese männlich spezifische Komponente zum Thema zahlreicher Untersuchungen geworden.

I.1.1. Definition des H-Y Antigens

Immunologisch gesehen stellt das H-Y Antigen ein sogenanntes "minor transplantation antigen" dar, das die klassischen Reaktionen einer starken zellulären und einer erheblich schwächeren humoralen Antwort hervorruft (Simpson, 1982).

Die zelluläre Reaktion beinhaltet Transplantatabstoßung, zellvermittelte Zytotoxizität, Reaktion vom verzögerten Typ, graft-versus-host Reaktion und die immunologische Toleranz (Simpson 1982, Gasser und Silvers, 1972). Der Nachweis dieser Antwort auf das H-Y Antigen konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen in vitro mit Hilfe der T-Zell-vermittelten Zytolyse = CML im $^{51}\text{Chrom}$ -Release-Test geführt werden (Goldberg et al., 1973; Gordon et al., 1975; Goulmy et al, 1978; v. Boehmer et al. 1979): Goldberg et al. gelang als ersten die Lyse männlicher Zielzellen mit Milz-Zellen aus weiblichen

Mäusen, die männliche Hauttransplantate erhalten hatten. Der Anteil an $^{51}\text{Chrom}$, das hierbei von den männlichen, radioaktiv markierten Zellen freigesetzt wird, entspricht dem Prozentsatz an lysierten, männlichen Zellen.

Goulmy bewies mit dem CML-Test männlich spezifische, zelluläre Reaktionen nach Transplantationen beim Menschen (Goulmy et al., 1976): Lymphozyten einer Patientin, die das Knochenmarktransplantat ihres Bruders abgestoßen hatte, zeigten sich in vitro zytotoxisch gegen männliche Zielzellen aus unterschiedlichen Individuen.

Neben den im Test wirksamen T-Killer-Lymphozyten benötigt die zelluläre Antwort auf das H-Y Antigen in vivo eine ganze Reihe von T-Zell-Subpopulationen. Sie wird genetisch kontrolliert von verschiedenen Regionen des Haupthistokompatibilitätskomplexes, H-2 bei der Maus, HLA beim Menschen, und von noch nicht exakt kartierten immune response Genen außerhalb dieses Komplexes (Hurme et al., 1978; Johnson, 1979; Fierz et al., 1982; Simpson, 1982). Bei den einzelnen Maus-Inzuchtstämmen war in vivo und in vitro für eine erfolgreiche Reaktion der Effektorzellen auf die Zielzelle einerseits die Übereinstimmung in den Haplotypen der H-2 Region K und D nötig, andererseits zeigten sie je nach ihrem H-2 Haplotyp der Region K, I und D unterschiedliche Reaktionen. Nur Stämme, deren Haplotyp das immundominante H-2^b enthielt, stießen als sogenannte responder Stämme männliche Transplantate ab (Bailey und Hoste, 1971; Bailey 1971; v. Boehmer et al, 1979; Gordon et al., 1976; Übersicht Simpson und Gordon 1977)

Die H-2 Restriktion bezieht sich nicht nur auf die reagierenden T-Zell-Subpopulation sondern auch auf die männliche Zielzelle, deren Immunogenität nicht in Zusammenhang steht mit ihrer Herkunft aus responder oder nonresponder Stämmen. Obwohl es sich bei der männlich spezifischen Zellkomponente aller untersuchten Mausstämmen um die gleiche Struktur zu handeln scheint (Simpson et al., 1979), sind die zellulären Reaktionen abhängig davon, mit welchem H-2 Haplotyp dieses H-Y Antigen gekoppelt auftritt (Silvers und Billingham, 1967; Wachtel et al., 1973; Králová und Lengerová, 1979).

Die Untersuchungen von Goulmy et al., 1977, 1978, 1983 zeigten HLA-Restriktion für das humane System: Die Zellen der Patientin, die das Transplantat ihres HLA-identischen Bruders abgestoßen hatte, waren nur zytotoxisch für männliche Zellen, die zudem das HLA A2 oder/und HLA B7 Antigen trugen.

Als humorale Antwort werden nach männlichen Hauttransplantationen oder Injektionen von Lymphozyten aus männlichen Mäusen in syngene weibliche Tiere spezifische Antikörper produziert (Goldberg et al., 1971; Übersicht Wachtel 1983). Der Versuch, monoklonale Antikörper gegen das H-Y Antigen zu produzieren, wurde zuerst von Koo et al. (1981) unternommen.

Bei den H-Y spezifischen Antiseren handelt es sich um niedrigtitrige Antiseren, wie sie bei der Antwort auf sogenannte "minor transplantation antigens" zu erwarten sind (Simpson, 1982). Verschiedene Testsysteme mit offenbar unterschiedlicher Zuverlässigkeit wurden entwickelt, um Antiseren auf ihren Gehalt an männlich spezifischen Antikörpern oder Zielzellen auf die Präsenz damit erkennbarer H-Y Antigene zu testen. Die spezifischen Antigene für diese Tests wurden im Maus- oder Rattensystem gewonnen.

Indirekte Tests wurden von Goldberg et al. (1971), Scheid et al. (1972), und Fellous et al. (1978) publiziert: Nach Adsorption des männlich spezifischen Antiserums an der zu testenden Zielzelle wird der nicht absorbierte Rest der Antikörper im komplementabhängigen Zytotoxizitätstest an unterschiedlichen Testzellen nachgewiesen. Mit dieser Methode wurde das H-Y Antigen bei fast allen Geweben männlicher Säuger gefunden (Müller et al., 1978; Wachtel et al., 1974). Moreira-Filho und Wachtel (1985) unterschieden humane Fibroblasten im "Elisa"-Test mit einem monoklonalen Antiserum. In diesem indirekten Testsystem macht ein Immunglobulin-gekoppeltes Enzymsystem nicht absorbierte H-Y Antikörper sichtbar.

Der direkte Nachweis des männlich spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes auf der Zelle wurde mit verschiedenen "Sandwich"-Methoden versucht: Nach der Reaktion von H-Y Antiseren mit männlichen Zellen wurden Fluoreszenzfarbstoff- oder Enzymgekoppelte Antikörper gegen die spezifischen Antikörper zugegeben; der Immunkomplex wird durch Fluoreszenz beziehungsweise Enzymreaktion sichtbar (Galbraith et al., 1978; Goulmy et al., 1983; Müller und Bross, 1979). Für humane Zellen sind wenige Ergebnisse mit direkten Nachweismethoden bekannt. Im Rosettentest zeigten Goldberg et al. (1978) eine unterschiedlich starke Adsorption von H-Y Antikörpern aus der Maus durch weibliche und männliche Leukozyten. Müller und Bross (1979) wiesen mit der Enzym-gekoppelten Sandwichtechnik eine größere Bindung von H-Y Antikörpern an männliche Fibroblasten nach. Van Leeuwen et al. (1979) und Goulmy et al. (1983) konnten mit Fluoreszenz-gekoppelter Sandwichtechnik menschliche weibliche und männliche Lymphozyten unterscheiden. Das männlich spezifische Antiserum dafür wurde aus Patientinnen gewonnen, die männliche Transplantate abgestoßen hatten. Im Gegensatz zu den übrigen serologischen Tests war hier auch die H-Y Spezifität des Antikörpers HLA-restringiert: das H-Y Antigen wurde vom Antiserum nur in Kombination mit den HLA-Haplotypen A2 oder/und B7 erkannt.

Grundsätzlich scheint der serologische Nachweis des H-Y Antigens, im Gegensatz zu den Methoden, die sich aus der zellulären Immunantwort ableiten, problematisch und zum Teil nicht zuverlässig genug (Zenzes und Reed, 1984; Crichton und Steel, 1985). Alle Untersuchungen, die weibliche Kontrollen durchführten, zeigten eine, wenn auch sehr schwache Bindungsaktivität der H-Y Antikörper auch für weibliche Zielzellen.

Es ist bislang noch nicht vollständig geklärt, inwieweit die unterschiedlichen immunologischen Phänomene von ein und derselben männlich spezifischen Struktur an der Oberfläche der Zelle hervorgerufen werden.

Das H-Y Transplantationsantigen (= CD-Antigen) scheint nicht identisch mit dem durch serologische Tests identifizierten, männlich spezifischen Antigen, das als SDM-Antigen bezeichnet wird (Silvers und Gasser, 1982). Erste Beweise hierfür brachten Melvold et al. (1977) mit einer mutierten männlichen Maus, die im serologischen Test H-Y positiv war. Hauttransplantate dieser Maus wurden jedoch von weiblichen Mäusen akzeptiert; die Maus ihrerseits stieß normale männliche Hauttransplantate ab. Nach Goldberg et al. (1972) gibt es Mausstämme, die, obwohl sie keine Transplantatabstoßung zeigten, H-Y Antikörper produzierten. Auch XO-Mäuse, die das SDM-Antigen zeigten (Engel et al., 1981a) tragen offenbar kein H-Y Transplantationsantigen an ihrer Zelloberfläche (Celada und Welshons, 1963; Simpson et al., 1982).

Andererseits weist die Tatsache, daß die Erkennung des SDM-Antigens bei Mäusen in den meisten Untersuchungen unabhängig vom H-2 Haplotyp war, darauf hin, daß der serologische Test eine andere Struktur erkennt als die T-Zell-vermittelte Zytolyse, die H-2 Restriktion aufwies. Koo (1981), die mit einem monoklonalen H-Y Antiserum die Lyse männlicher Zellen durch zytotoxische T-Zellen blockieren konnte, hält es für denkbar, daß es sich hierbei um zwei eng benachbarte Strukturen auf der Zelloberfläche handelt.

Schließlich sind nach Hurme et al. (1978) und Juretić et al., (1985) die immune response Gene, die für die Antwort auf das H-Y Transplantationsantigen verantwortlich sind, unterschiedlich zu denen, die die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität auf ein männliches Antigen kontrollieren.

Es ist also möglich, daß sowohl die serologischen Tests, als auch die der T-Zell-vermittelten Zytolyse männlich spezifische Strukturen an der Zelloberfläche erkennen, die nicht identisch mit dem ursprünglichen H-Y Transplantationsantigen sind; auch unterschiedliche antigene Determinanten an einer männlich spezifischen Komponente wären denkbar.

1.1.2. Genetik des H-Y Antigens

Über die genetische Kontrolle des H-Y Antigens wird bislang noch diskutiert.

1955 postulierte Hauschka ein Gen auf den Y-Chromosom, das die bei der Transplantationsabstoßung erkannte, männlich spezifische Struktur codiert. Koo et al. (1977) stellten ein für die Expression des H-Y Antigens verantwortliches, genetisches Element fest, das auf dem Y-Chromosom in der Nähe des Zentromers, meist auf dem kurzen Arm lokalisiert war. Die ursprüngliche Ansicht, es handle sich hierbei um ein

Strukturgen für das H-Y Antigen, mußte revidiert werden, da das H-Y Antigen von Wolf et al. (1980b) auch ohne Anwesenheit eines Y-Chromosoms nachgewiesen wurde: Zellen von Patientinnen mit dem XO-Turner-Syndrom absorbierten H-Y Antikörper, wenn auch in geringerem Ausmaß als männliche XY-Kontrollzellen.

Nach einer derzeit häufig vertretenen Theorie handelt es sich bei diesem Y-chromosomal Element um eine positiv regulierende Einheit für die Expression des H-Y Antigens, dessen Strukturgen demnach auf einem Autosom lokalisiert ist (Polani und Adinolfi, 1983). Zusätzlich wird ein Repressorelement für das H-Y Strukturgen auf dem X-Chromosom in der Region Xp 223 postuliert (Wolf et al., 1980a), das nicht der X-Inaktivierung unterliegt.

Entsprechend einem von Adinolfi et al. (1982) aufgestellten Modell produziert ein autosomales Gen zunächst einen Precursor H-Yp, der unter Einfluß eines Y-codierten Genes zum H-Ya Antigen wird. Durch ein nicht inaktiviertes X-codiertes Gen wird H-Yp andererseits zu einer mit H-Y verwandten Substanz H-Yr, die keine Rolle bei der männlichen Geschlechtsspezifität spielt. In serologischer Hinsicht könnten Kreuzreaktionen durch die Ähnlichkeit des Precursors H-Yp mit H-Ya auftreten.

Die H-Y Antigen-Bestimmung bei verschiedenen gonosomalen Aberrationen steht im Einklang mit beiden Theorien: Fibroblasten und Lymphozyten von Männern mit dem Karyotyp 47,xyy wurden gegenüber 46,xy Zellen als stärker H-Y Antigen positiv bestimmt (Wachtel et al., 1975b; Fraccaro et al., 1982; Moreira-Filho und Wachtel, 1985). Männliche Fibroblasten oder Lymphozyten mit zusätzlichen X-Chromosomen, wie zum Beispiel 49,xxxxy, waren schwächer positiv als normale männliche Kontrollen. Der zitierte Befund von Wolf wurde durch die meisten serologisch definierten H-Y Befunde für humane XO-Zellen (Wachtel et al. 1980; Koo et al., 1981) und XO-Mäuse (Engel et al., 1981a) bestätigt.

Die Ergebnisse für XO-Zellen mit Tests, die sich auf das durch Transplantation oder T-Zellantwort definierte H-Y Antigen beziehen, werden durch diese Theorien nicht ausreichend erklärt. Zwar konnte Wiberg XX-Mäuse durch Injektion von humanen XO-Fibroblasten sensibilisieren: anschließende XY-Maustransplantate wurden, ebenso wie nach Kontrollsensibilisierung mit XY-Fibroblasten, schneller abgestoßen (Wiberg, 1985). Celada und Welshons (1963) jedoch konnten diese second graft Reaktion für XO-Mäuse nicht nachweisen. Auch Simpson et al. klassifizierten mit Transplantationsversuchen und Untersuchungen der T-Zell-vermittelten Zytolyse XO-Mäuse als H-Y negativ (Simpson, 1982); die XO-Mäuse selbst reagierten zytotoxisch auf männliche Zellen.

Möglicherweise können weitere Untersuchungen an XX- oder XO-Männern und männlichen Mäusen den genetischen Hintergrund des H-Y Antigens klären. Solche durch sogenannte sexreversed Mutationen entstandenen Individuen waren meist H-Y positiv entsprechend den serologischen Nachweismethoden, der Transplantatabstoßung und der T-Zell-vermittelten Zytolyse (Bennett et al., 1977; Müller und Bross, 1979; Simpson et al., 1981). Je nach der genetischen Basis des H-Y Antigens müßte es sich in diesen Fällen um Mosaik mit Verlust des Y-Chromosoms, um Translokationen von Y-chromosomalem Material auf ein anderes Chromosom oder um die Mutation eines vorhandenen Gens handeln (Übersicht Wachtel, 1983).

Hinsichtlich der molekularen Evolution stellt das H-Y Antigen scheinbar eine sehr konservative Struktur dar. Wachtel et al. (1974) entdeckte, daß H-Y Antiseren aus der Maus, die männlich spezifische Strukturen der eigenen Spezies erkannten, kreuzreagierten mit männlichen Zellen von Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Menschen. In der Folge wurden viele der oben zitierten Studien an humanen Zellen mit H-Y Antiseren aus Mäusen durchgeführt. Durch Kreuzreaktivität konnte das H-Y Antigen bei den verschiedensten Vertebraten und Invertebraten analysiert und jeweils für die Zellen festgestellt werden, die dem heterogametischen Geschlecht entstammten (Übersicht Wachtel, 1983). So erwiesen sich bei Säugern die männlichen Zellen als H-Y Antigen positiv, bei Vögeln dagegen die Gewebe weiblicher Tiere, die in diesem Fall heterogametisch, XY oder "ZW" sind (Wachtel et al., 1974; Engel et al., 1981b).

Die Ergebnisse lassen zumindest auf eine weitverbreitete und große Ähnlichkeit einer Zelloberflächenstruktur schließen, die charakteristisch ist für das heterogametische Geschlecht.

1.1.3. Funktion des H-Y Antigens

Der bemerkenswerte phylogenetische Konservatismus, sowie das geschlechtsgekoppelte Auftreten des H-Y Antigens waren die Basis für Hypothesen über eine Rolle des H-Y Antigens bei der primären Geschlechtsdifferenzierung. Ihm wurde die Funktion zugeschrieben, die Entwicklung der indifferenten, embryonalen Gonade bei Spezies mit männlichem heterogametischem Geschlecht zu Testisgewebe zu induzieren (Wachtel et al., 1975a; Ohno, 1976). Ohne H-Y Antigen wird konstitutiv ein Ovar entwickelt. Entsprechend dieser Hypothese würde das H-Y Antigen z. B. bei Vögeln, die heterogametisch im weiblichen Geschlecht sind, die Ovarentwicklung induzieren. Speziell für das Gonadengewebe wird ein membrangebundener Rezeptor angenommen, dessen

Wechselwirkung mit dem in allen heterogametischen Geweben produzierten H-Y Antigen die Gonadendifferenzierung induziert (Ohno, 1977; Nagai et al., 1979).

Die Hypothese wurde zunächst durch die Experimente nach der Methode von Moscona (1961) gestützt. Artifizuell dissoziierte, neonatale Zellen aus Testisgewebe reaggregierten normalerweise wieder zu tubulären Strukturen. Nach Zugabe von H-Y Antiseren ergaben sich jedoch "spherische" oder Follikel-ähnliche Strukturen. (Ohno et al., 1978; Übersicht Wachtel, 1983).

Daneben zeigten die zitierten Tests auf das H-Y Antigen normalerweise eine Korrelation der Präsenz von Y-Chromosomen, H-Y Antigen und Testesentwicklung. Problematisch allerdings scheint die Erklärung der serologisch H-Y Antigen-positiven XO-Turnerpatienten ohne Testesentwicklung. Dieser Befund wurde mit einem Schwellenwert für H-Y Konzentration und Testesinduktor-Wirksamkeit erklärt. Zudem klassifizierten neuere Untersuchungen verschiedene sexreversed XX- und XO-Mäuse als H-Y negativ (Mc Laren et al., 1984, Burgoyne et al., 1986). Diese Mäuse mit einer X-Y Translokation zeigten zwar keine Spermatogenese, entwickelten jedoch Testisgewebe.

Eine direkte Evidenz für das H-Y Antigen als Testis-Induktor ist bislang nicht gegeben (Silvers et al., 1982). In letzter Zeit wurden Hypothesen aufgestellt, die ein gonosomal lokalisiertes Gen der Testisdifferenzierung zugrunde legen, das unabhängig von der H-Y codierten Sequenz ist (Simpson, 1986; Chandra, 1985).

1.1.4. Biochemische Natur des H-Y Antigens

Nur wenige Ergebnisse sind publiziert, die versuchen, das H-Y Antigen biochemisch zu charakterisieren.

Nagai et al. (1979) untersuchten Proteine, die von der Burkitt-Lymphom Zelllinie DAUDI abgesondert werden. Da dieser Zelllinie das HLA-B₂-Mikroglobulin Dimer fehlt, das als Verankerungsmolekül für das H-Y Antigen an der Zelloberfläche gilt, gibt sie nach Nagai et al. H-Y Antigen in das Zellkulturmedium ab. Durch Inkubation mit Ovarzellen, die der beschriebenen Hypothese zufolge einen gonadenspezifischen H-Y Rezeptor tragen, wurde aus dem Medium ein Protein entfernt. Nagai et al., bezeichnen dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 18kD in der monomeren Form als H-Y Antigen. Es zeigt eine Tendenz zur Bildung von Polymeren auf Grund von Disulfidbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen.

Hall und Wachtel (1980) halten nach Immunpräzipitation im Maussystem zwei Proteine mit den Molekulargewichten 18kD und 31kD und einem isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 für mögliche H-Y Strukturen. Aus der solubilisierten Zellmembran von Sertolizellen wurden durch Zugabe von H-Y spezifischem Antiserum Immunkomplexe gebildet,

die durch einen zweiten, gegen den spezifischen Antikörper gerichteten Antikörper präzipitiert wurden. Das Proteingemisch wies gegenüber dem mit unspezifischen Antisera erhaltenen zusätzlich diese beiden Polypeptide auf.

Durch Immunpräzipitation mit H-Y Antisera aus der Maus und Protein A-Sepharose erhielten Hall et al. aus dem Medium von DAUDI Zellen zusätzlich zu unspezifisch präzipitiertem Material ein hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 15-18kD (Hall et al., 1981). Bradley und Heslop (1985) isolierten durch Immunpräzipitation mit H-Y Antisera von Ratten aus dem Medium von DAUDI Zellen drei Polypeptide mit Molekulargewichten von 20kD, 50kD und über 200kD.

Nach Shapiro und Erickson (1981) ist die serologische Determinante des H-Y Antigens ein Kohlehydrat. Die Bindung von H-Y Antisera an männliche Maus-Epidermiszellen wurde nach Einwirkung proteolytischer Enzyme nicht reduziert. Nach Behandlung der Zellen mit β -Galaktosidase oder Galaktoseoxidase wurde die Absorption von H-Y Antikörpern jedoch um 29 - 54 % herabgesetzt. Ein terminaler Galaktosylrest am nicht reduzierenden Ende des Glykoproteins ist hiernach verantwortlich für die H-Y Spezifität.

1.1.5. Weitere geschlechtsspezifische Strukturen

Im Hinblick auf die Differenzierung der primären Geschlechtsorgane sowie deren Funktionserhaltung sind einige molekular definierte Wirkstoffe bekannt, wie z.B. der Oviduktrepressor, spezielle Antigene auf Sertoli- und Follikelzellen, oder Sexualhormone, sowie deren spezifische Rezeptoren und metabolisierende Enzyme in der Zelle (Übersicht: Wilson, 1985; Polani und Adinolfi, 1983). Sie werden genetisch kontrolliert von Genen, die einzelnen Autosomen oder dem X-Chromosom zugerechnet werden. Ihre Expression ist entweder auf geschlechtsspezifisches Gewebe beschränkt oder zwischen männlichen und weiblichen Organismen rein quantitativ unterschiedlich.

Neben verschiedenen X-chromosomal codierten Enzymen und anderen Polypeptiden (Cox et al., 1981) sind vier Zelloberflächen-Antigene beschrieben, deren Genloci auf dem X-Chromosom liegen.

Das Xg-Antigen wurde nur auf Erythrocyten nachgewiesen (Übersicht Race und Sanger, 1975). Hope et al. (1982) wiesen für humane Fibroblasten und Lymphozyten ein als R1 bezeichnetes Antigen nach, dessen Genort auf dem langen Arm des X-Chromosoms liegt. Die Charakteristika des von Goodfellow und Tippett (1981) beschriebenen 12 E7 Antigens ähneln denen, die für ein O13 Antigen von Dracopoli et al. (1985) festgestellt wurden. Beide hatten Molekulargewichte zwischen 20kD und 30kD und wurden sowohl auf humanen Fibroblasten als auch auf verschiedenen anderen Geweben gefunden. Das

12 E7 Antigen wird, wie auch das O13 Antigen, von einem Gen codiert, das nicht nur auf dem nicht inaktivierten Teil des X-Chromosoms, sondern wahrscheinlich auch auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist (Goodfellow, 1983); eine geschlechtsbezogene Untersuchung von Zellen hinsichtlich einer Gendosis-abhängigen Quantität der Antigene 12 E7 und O13 ist dementsprechend nicht möglich.

1.2. ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE

Die zweidimensionale Gelelektrophorese, eine Kombination aus Isoelektrofokussierung und anschließender Elektrophorese in Polyacrylamidgelen, wird derzeit als die Methode mit maximalem Auflösungsvermögen zur Darstellung komplexer Proteingemische angesehen (Klose, 1985). Durch die Zuordnung der Parameter isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht zu jedem Protein entsteht ein für die untersuchte Fraktion typisches 2-dimensionales Proteinmuster mit qualitativ und quantitativ charakterisierten Komponenten.

Die 2D-Analyse wurde zunächst für die Trennung von Proteingemischen, wie zum Beispiel Serumproteine (Kenrick und Margolis, 1970), ribosomale Proteine (Kaltschmidt und Wittmann, 1970), chromosomale Proteine (Barrett und Gould, 1973), Membranproteine, wie die der Erythrozytenmembran (Bhakdi et al., 1974) oder Proteine aus Pflanzenextrakten (Macko und Stegemann, 1969) entwickelt. Verschiedene Modifikationen ermöglichten schließlich vor gut 10 Jahren die Auftrennung hochkomplexer Fraktionen, wie dem Zellprotein von E.coli (O'Farrell, 1975) und Zellextrakten aus ganzen Mausembryonen oder einzelnen Organen der Maus (Klose, 1975) in Muster mit bis zu 1000 Polypeptiden. Für humane Fibroblasten gelang Klose 1983 die Auflösung von ca. 2000 Proteinflecken in einem Muster (Klose, 1983).

Neben der Darstellung und Charakterisierung von Proteinen ist mit der 2D-Analyse die Feststellung quantitativer oder qualitativer Veränderungen von einzelnen Polypeptiden beim Vergleich zweier Proteinmuster möglich. Die Quantität wird bestimmt durch die Größe und Intensität seines Proteinflecks = Spot. Qualitative Unterschiede beziehen sich auf seine Präsenz und geringfügige Positionsveränderungen des Spots im Muster. Diese Verschiebungen werden in der horizontalen Achse durch Ladungsheterogenität und in der vertikalen durch Molekulargewichtsunterschiede hervorgerufen. Sie haben ihre Ursache entweder in transkriptionaler bzw. allelischer Heterogenität oder in post-transkriptionalen Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung, Azetylierung, Methylierung, Glykosylierung und unterschiedlichem Sialinsäuregehalt des Proteins.

Die 2D-Gelelektrophorese wird zur Klärung von Fragestellungen auf unterschiedlichen Gebieten, wie der Embryogenese, der Zytologie, der Mutagenese und klinischen Diagnostik, sowie der molekularen Evolution und der Genetik herangezogen. Aus der Fülle der Untersuchungen werden an dieser Stelle nur einige erwähnt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Interesse sind.

1.2.1. Zytologie

Im Bereich der Zytologie wurden, neben Vergleichen verschiedener Zelltypen, wie zum Beispiel humaner Fibroblasten und Lymphozyten (Giometti et al. 1982) oder Zelllinien verschiedener Spezies (Fey et al., 1984), Erkenntnisse über die Zelldifferenzierung, den Zellzyklus und die Funktion einzelner Zellstrukturen gewonnen. Hierzu geht der 2D-Analyse im allgemeinen eine Kompartimentierung des Zellmaterials voraus. Den einzelnen Zellfraktionen können typische 2D-Proteinmuster zugeordnet werden. Durch verschiedene Präparationsmethoden wird eine Auftrennung der Zelle in funktionelle Einheiten erreicht:

Mit einer radioaktiven Markierungstechnik intakter Zellen werden allein die Zelloberflächenproteine markiert und nach Autoradiographie der 2D-Elektrophorese des gesamten Extrakts sichtbar. Comings und Cohen (1979) konnten mindestens 80 Proteine für die Zelloberfläche von humanen Fibroblasten auftrennen, unter denen die hochmolekularen meist als "Spot-Reihen" auftraten; solche Proteine zeichnen sich durch unterschiedlichen isoelektrischen Punkt bei gleichem Molekulargewicht aus und zählen häufig zu den Glykoproteinen. Ihre Funktion als Zell-Zell-Erkennungsfaktoren, Histokompatibilitätsantigene oder Hormonrezeptoren wird zur Diskussion gestellt. Mit derselben Technik verglichen Giometti et al. (1982) humane periphere Lymphozyten mit den adherent wachsenden Fibroblasten und wiesen für die Proteine Aktin, Vimentin und Tropomyosin eine verantwortliche Rolle für das adherente Wachstum gegenüber Suspensionskulturen nach.

Nach Behandlung von Fibroblasten mit antimitochondrialen Antigenen, wie Nonactin oder Valinomycin identifizierte Anderson (1985) für Mitochondrien mindestens 5 typische Proteine durch ihr Fehlen im 2D-Muster des totalen Zellextrakts, wobei die Synthese eines dieser Proteine durch Interferon induzierbar war.

Die häufigste Anwendung finden präparative Unterscheidungen in lösliche zytoplasmatische und strukturgebundene Proteine des Zellskeletts. Neben der Möglichkeit differenzierterer Aussagen wird hierdurch das Auflösungsvermögen für die gesamte

Zellfraktion erhöht und die Analyse durch einzelne, übersichtlichere 2D-Proteinmuster erleichtert. Klose erreicht diese Kompartimentierung mit differentieller Zentrifugation des geernteten Zellmaterials (Klose et al., 1983). Andere Arbeitsgruppen (Leavitt und Kakunaga, 1980; Bravo et al., 1982; Giometti und Anderson, 1981) nehmen diese Trennung durch Behandlung der Zelle in vitro mit nichtionischen Detergentien, wie Nonidet P40 oder Triton X-100 vor. Zytoplasmatisches Material wird hierbei aus den filamentösen Strukturen ausgelöst, die mit dem Kern verankert, am Substrat haften bleiben. Zur Identifikation einzelner, detergenzlöslicher Komponenten, die in der 2D-Analyse mit spezifischen Antikörpern oder durch Coelektrophorese erfolgt, ist bislang nur sehr wenig bekannt.

Das Zellskelett, dessen Komponenten auch im 2D-Muster der gesamten Zelle erfaßt werden, ist mikroskopisch sichtbar und entscheidend an der Regulierung von Zellwachstum, Proliferation und Zellbewegung beteiligt. Nach 2D-Analysen der damit korrelierten Proteinzusammensetzung, kombiniert mit elektronenmikroskopischen und immunologischen Untersuchungsmethoden, unterscheidet man drei Hauptbestandteile (Weber und Osborn, 1985; Bravo et al., 1982; Giometti et al., 1982): die Mikrotubuli, die Mikrofilamente und die intermediären Filamente.

Die Mikrotubuli mit ca. 25 nm Durchmesser sind verantwortlich für die Chromosomenbewegung in der Mitose, für den intrazellulären Transport der Organellen und die Bewegung der Zelle bei der Gewebsdifferenzierung. Ihre Hauptkomponente ist das Tubulin, bestehend aus mindestens 2 Proteinen, die als Spots zweidimensional identifizierbar sind (Mr 55-60kD, pl ca. 5,1, nach Leavitt und Kakunaga, 1980).

Als kontraktiles Element gelten die Mikrofilamente mit ca. 6 nm Durchmesser, die bei Nichtmuskelzellen aus β - und γ -Aktin (Mr 42kD, pl 5,3, nach Leavitt und Kakunaga, 1980) und verschiedenen aktinbindenden Proteinen bestehen; unter letzteren sind für Fibroblasten vor allem vier Tropomyosine bekannt (Mr 30-36kD, nach Talbot und MacLeod, 1983), die wahrscheinlich von unterschiedlichen Genen codiert werden. Für eines der Tropomyosine konnten Giometti et al. (Giometti und Anderson, 1984; Giometti et al. 1985) drei genetische Polymorphismen nachweisen. Die Mikrofilamente spielen eine Rolle bei der Zellbewegung, der Membranfaltung, der Zytokinese, sowie bei Exo- und Endocytose.

Die Funktionen der intermediären Filamente als zweite strukturelle Komponente mit 10 nm Durchmesser sind noch unklar. Nach Lehto und Virtanen (1978) besteht ihre Aufgabe in der Verankerung des Kerns in der Zelle und am Wachstumssubstrat bei kultivierten Fibroblasten-Monolayern. Ihre Proteinzusammensetzung variiert je nach Zelltyp und enthält in vielen Fällen vor allem Vimentin (Mr 54kD, nach Bravo et al., 1982) und Cytokeratine (Mr 40-50kD, nach Bravo et al., 1982).

Bravo und Celis, deren Untersuchungen an HeLa-Zellen und Fibroblasten entscheidend zur heutigen Kenntnis des Zellskeletts beigetragen haben, vermuten für Vimentin eine Funktion bei der Regulation der Zellteilung. 2D-Analysen synchronisierter Zellen zeigten neben starken quantitativen Veränderungen für mindestens 20 Zellproteine während des Zellzyklus das Auftreten mehrerer orthophosphorilierter Vimentinderivate nur während der G₂-Phase der Mitose (Bravo et al., 1982).

Die intermediären Filamente, die wegen ihrer zell-spezifischen Zusammensetzung eine Unterscheidung verschiedener Zelltypen möglich machen, werden in der Krebsdiagnostik zur Charakterisierung der einzelnen Tumorarten herangezogen (Moll et al., 1982). Außerdem bewiesen Studien am Zellskelett transformierter Fibroblasten in der 2D-Analyse Veränderungen der Proteineigenschaften vor allem für β -Aktin (Leavitt et al., 1982) und die Tropomyosine (Hendricks und Weintraub, 1981) sowie des Phosphorylierungszustands der Zelle (Unteregger, 1984).

1.2.2. Genetik

Kultivierte Fibroblasten erwiesen sich, neben Lymphozyten, als günstiges Material für Untersuchungen zytogenetischer und genetisch bedingter metabolischer Defekte mit dem Ziel, die primär betroffenen Proteine zu identifizieren.

Vergleiche humaner Fibroblasten von Patienten mit Trisomie 21 (Weil und Epstein, 1979; Klose et al., 1982), Trisomie 13, 16 und 18 (Willers et al., 1981) oder Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (Burghes et al., 1982) gegenüber normalen Fibroblasten zeigten einige, meist quantitativ variierende Proteine, die bei dem jeweiligen Krankheitsbild gehäuft auftraten. Sie werden als Resultat sekundärer Reaktionen der Zelle auf den Primärdefekt verstanden. Anderson untersuchte 63 Fibroblasten-Zelllinien von Gesunden und Patienten mit 37 verschiedenen Erbkrankheiten, wie zum Beispiel cystischer Fibrose, Xeroderma pigmentosum oder systemischer Sklerose, wobei die Auswertung der 2D-Muster mit einem Computerprogramm vorgenommen wurde (Anderson et al., 1984). Allerdings gelang auch hier in keinem Fall die Feststellung einer für die jeweilige Krankheit charakteristischen, qualitativen Proteinvariante, die einen Schluß auf das primär defekte Protein zuließe.

Studien über individuelle Proteinvarianten, also Polymorphismen im 2D-Muster von Fibroblasten wurden vor allem von Walton et al. (1979), McConkey et al. (1979), Klose

et al., (1983) und Anderson et al. (1984) durchgeführt. Es ergaben sich zwischen ca. 0,5% (Mc Conkey et al., 1979) und 1% (Walton et al., 1979; Anderson et al., 1984; Klose et al., 1983) qualitative Polymorphismen bei 100 - 800 ausgewerteten Proteinen. Klose konnte alle quantitativen Polymorphismen durch oben erwähnte Kompartimentierung den löslichen Proteinen zuordnen. In strukturgebundenen Proteinen fand er keine qualitativen und lediglich 3,5% quantitative Polymorphismen gegenüber 11% in den löslichen sowie 7% in den Gesamtzell-Proteinen.

Die Heterozygotie für qualitative Polymorphismen lag bei allen Arbeitsgruppen mit weniger als 1% deutlich unter dem mit klassischen biochemischen Methoden beobachteten Wert von 6% (Harris et al., 1977). Untersuchungen auf dem Gebiet der molekularen Evolution gehen zwar davon aus, daß es sich bei Fibroblasten um genetisch konservativere Zelltypen handelt (McConkey, 1982). Allerdings zeigten auch die Muster von humanen Lymphozyten (Hamaguchi et al., 1981; Goldman und Merrill, 1983) eine Heterozygotie von nur 1% (Hamaguchi et al., 1981) bis 2,4% (Goldman und Merrill, 1983).

Diese Diskrepanz ist vermutlich mit der Tatsache zu erklären, daß die 2D-Analyse vor allem Polypeptide darstellt, deren Funktion eine Mutation selten tolerieren kann (Walton et al., 1979; Dunn und Burghes, 1983); die Einbindung von Proteinen in stabile multimolekulare Komplexe zum Beispiel wird eine Veränderung ihrer Primärsequenz kaum zulassen. Diesen Polypeptiden gegenüber sind die mit klassischen Methoden vor allem erfaßten Enzyme quantitativ in der Zelle viel schwächer vertreten und im 2D-Muster nur teilweise erfaßt.

Seit 1980 wird die 2D-Gelelektrophorese zusammen mit den neuen Methoden der DNA-Analyse für die Identifikation der Genprodukte einzelner Chromosomen verwendet. Es wurden Zellhybride aus Nagerzellen und humanen Zellen produziert und ihre 2D-Muster mit denen der ursprünglichen Nager- bzw. humanen Zelle verglichen. Da diese Zellhybride ein einziges Chromosom humaner Herkunft enthielten, konnte so nach Proteinen gesucht werden, die von diesem Chromosom codiert werden. Cox et al. (1981) identifizierte für Zellhybride aus Hamsterzellen mit humanen Fibroblasten fünf verschiedene Proteine, die mit dem X-Chromosom korreliert sind. Taggart und Francke (1982) konnten auf diese Weise 22 Proteine neun verschiedenen, humanen Chromosomen zuordnen; darunter waren drei mit dem X-Chromosom assoziierte Proteine. Auch Müller und Voiculescu (1984) fanden drei Proteine, die sie als X-gekoppelt bezeichnen. Bisher wurden keine mit dieser Methode gefundenen Y-codierten Proteine publiziert. Die Herstellung von Zellhybriden, die nur das Y-Chromosom enthalten, scheint allerdings nur in seltenen Fällen erfolgreich zu sein. Allein im Vergleich von 2D-Mustern

von Fibroblasten aus monozygoten Zwillingen mit der gonosomalen Konstellation XO bzw. XY halten Müller et al. (1984) zwei Proteinflecken für Y-abhängige Polypeptide.

1.3. ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit geprüft, in der Proteinzusammensetzung von humanen Fibroblasten eine oder mehrere Komponenten zu identifizieren, die mit der gonosomalen Konstellation einer Zelle assoziiert sind, insbesondere solche, die mit der Anwesenheit oder Abwesenheit des Y-Chromosoms in Verbindung stehen.

Die Suche nach diesen Komponenten sollte durch die vergleichende Analyse der mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese erstellten Proteinmuster aus Präparationen kultivierter Fibroblasten erfolgen. Hierzu wurden verschiedene, definierte und vergleichbare Proteinextraktionen bei einer Stichprobe von Zelllinien gesunder männlicher und weiblicher Personen unterschiedlichen Alters sowie von Patienten mit verschiedenen gonosomalen Aberrationen durchgeführt. Um eine möglichst große Anzahl von Proteinen einer Zelle in der Analyse zu erfassen, wurden zwei unterschiedliche Zellkultur-Bedingungen gewählt und die Proteinmuster mit den beiden Methoden der Autoradiographie und Silberfärbung dargestellt.

Varianten im Proteinmuster, die eventuell in Zusammenhang mit dem Gehalt an Geschlechtschromosomen einer Zelle standen, sollten abgegrenzt werden gegen solche, die durch Zellwachstumsunterschiede oder in anderer Weise genetisch bedingt sind. Zur vergleichenden Analyse von Zelllinien mit einem Maximum an genetischer Identität und damit unter Ausschluß von individuellen Polymorphismen wurde die Klonierung von Zelllinien durchgeführt, die Mosaik aus Subpopulationen mit unterschiedlicher Gonosomenkonstellation darstellten.

Für den Fall einer mit dem Y-Chromosom korrelierten Proteinvariante wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, diese mit sogenannten H-Y Antiseren auf Ähnlichkeit mit der als H-Y Antigen bezeichneten Struktur zu testen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. ZELLKULTUR

2.1.1. Zellen

Die Fibroblasten-Zelllinien stammten aus Hautbiopsien, die pränatal oder postnatal am Oberarm oder Oberschenkel entnommen wurden. Zusätzlich wurden zwei Fibroblasten-Zelllinien aus humanem Lungengewebe und eine aus dem Skrotum gewonnen.

Sie wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

Prof. Dr. H. Höhn	Institut für Humangenetik, Universität Würzburg
Dr. A. Wirtz	Abteilung Pädiatrische Genetik, Kinderpoliklinik der Universität München
Dr. K. G. Wurster	Frauenklinik der Universität Tübingen
Prof. Dr. M. Hirsch-Kaufmann	Institut für Medizinische Biologie, Universität Innsbruck
Dr. K. Miller	Institut für Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover

2.1.2. Kulturmedien

DMEM Medium	: Dulbeccos Modified Eagle Medium (Boehringer, Mannheim) + L-Glutamin (4 mM)
RPMI Medium	: RPMI 1640 Medium, leuzinfrei und leuzinhaltig (Boehringer, Mannheim) + L-Glutamin (2 mM)
Wissler Medium	: BM 86-Wissler Medium (Boehringer, Mannheim).

2.1.3. Kulturbedingungen

Die Zelllinien wurden als Monolayer in Plastik-Kulturflaschen (75 cm², Falcon, Oxnard, Kalifornien) in DMEM Medium mit 20% fötalem Kälberserum (Boehringer, Mannheim) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 E/10000 µg/ml, Seromed, Berlin, BRD) bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration kultiviert. Je nach Teilungsrate und Stoffwechselzustand wurden die Zellen jeden dritten bis fünften Tag durch Mediumwechsel gefüttert.

Sobald ein konfluenten Zellrasen erreicht war, wurde passagiert: Der Monolayer wurde mit PBS (= Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen und mit wenig Trypsin/EDTA-Lösung (Trypsin 0,05%, EDTA-Lösung 0,02%, Ca^{++} und Mg^{++} frei, Boehringer, Mannheim) abgelöst. Zur Vermehrung des Zellmaterials wurde die erhaltene Zellsuspension vor dem erneuten Aussäen im Verhältnis 1 : 2 verdünnt.

2.1.4. Zellaufbewahrung

Die Zelllinien wurden zur Aufbewahrung bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden semikonfluente Monolayer, wie unter 2.1.3. beschrieben, trypsiniert und mit leuzinhaltigem RPMI Medium gewaschen. Die Zellen wurden in leuzinhaltigem RPMI Medium mit 25% fötalem Kälberserum und 10%iger DMSO-Lösung (Merck, Darmstadt) mit einer Zelldichte von ca. 1×10^7 Zellen/ml suspendiert und in flüssigem Stickstoff langsam auf -60°C abgekühlt (Einfriergerät von Union Carbide, Durham, Großbritannien).

2.1.5. Radioaktive Markierung

Zur autoradiographischen Auswertung von Zellextrakten wurden die Fibroblasten in Kultur metabolisch markiert.

Bei etwa 80% Konfluenz wurde der Monolayer einmal mit PBS und zweimal mit leuzin-freiem RPMI Medium gewaschen. Es folgte eine 20-stündige Markierungsphase in leuzinfreiem RPMI Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 . Pro 1×10^7 Zellen wurden dem Medium 120 μCi ^3H -Leuzin ($\text{L-[3,4,5-}^3\text{H(N)]}$ -Leuzin, spezifische Aktivität 146,5 mCi/mmol, New England Nuclear, Dreieich, BRD) zugegeben. Die anschließende Zellernte wurde gemäß den Beschreibungen unter 2.5.1. und 2.5.2. durchgeführt.

2.2. ZELLKLONIERUNG

Die Zelllinien von drei Patienten (F87, F85, F86) enthielten heterogene Fibroblastenpopulationen, deren Karyotyp sich durch den Gehalt an Geschlechtschromosomen unterschied:

F87: 46,xx (86,5%); 47,xxxy (10,8%); 48,xxxy (2,7%);

F85: 46,xy (62%); 45,xo (38%);

F86: 46,xy (52%); 45,xo (48%).

Für die isolierte und vergleichende Analyse der einzelnen Populationen wurde eine Klonierung dieser drei Mosaik-Zelllinien vorgenommen. Die Durchführung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Jungfer - Firma Boehringer, Tutzing - unterstützt.

Zur Eliminierung von möglichen Mykoplasmen-Kontaminationen wurden die Zellen zunächst bis zu 14 Tagen mit Tiamutin (10 µg/ml) und Minocyclin (5 µl/ml) vorbehandelt. Die Kontrolle auf Infektion mit Mykoplasmen erfolgte durch die DNS-Anfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258, Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover) nach der Methode von Hightower et al. (1981).

Die Mosaik-Zelllinien waren von Kultivierungsbeginn bis zur Klonierung zwei- bis fünfmal passagiert worden.

Mit Hilfe eines Zytofluorographs (System 50H, Ortho Diagnostic Systems Inc., Massachusetts) wurde aus der verdünnten Suspension der Fibroblasten-Zelllinie je eine Einzelzelle in jede Vertiefung (=well) einer Mikrotiter-Platte (96 wells, Nunc, Roskilde, Dänemark) verteilt; die Vertiefungen waren mit 2% Gelatine beschichtet worden und enthielten 100 µl konditioniertes DMEM Medium mit 20% fötalem Kälberserum. Konditioniertes Medium wurde durch Zentrifugation aus Medium gewonnen, in dem gut wachsende, normale Fibroblasten kultiviert worden waren. Nach 5 Tagen wurden pro well 50 µl frisches Kulturmedium zugegeben.

Unter ständiger mikroskopischer Kontrolle entwickelten sich durch mehrfache Zellteilung aus den Einzelzellen kleine Kolonien, die bei ausreichender Zelldichte trypsinisiert (siehe 2.1.3.) und in die Vertiefungen einer Platte mit 24 wells transferiert wurden. Durch mehrfaches Passagieren und Verdünnen der Zellsuspension war die Zellmenge jedes einzelnen Klons schließlich für die Kultivierung in Kulturflaschen der üblichen Größe (75 cm²) ausreichend.

Zur Überprüfung der Homogenität wurde für jeweils 50 Zellen jedes einzelnen Klons der drei Mosaik-Zelllinien eine Geschlechtschromosomenbestimmung durchgeführt.

2.3. CHROMOSOMENANALYSE

Um genügend Zellen in der Metaphase zur Chromosomenanalyse zu erhalten, wurde dem semikonfluenten Zellrasen ca. vier bis sechs Stunden vor der Ernte Colcemid ($0,8 \mu\text{g}/1 \text{ ml}$ Medium, Merck, Darmstadt) zugegeben. Nicht adherente mitotische Zellen wurden aus dem Medium abzentrifugiert und zusammen mit den adherenten Zellen, die abtrypsiniert wurden (siehe 2.1.3.), nach der Vorschrift von Moorhead et al. (1960), weiterverarbeitet. Durch 15-minütige Inkubation in KCl-Lösung (75 mM) bei 37°C erfolgte die hypotonische Lyse der Zellen. Die Zellkerne wurden bei 1200 Upm abzentrifugiert und mehrfach mit Fixierlösung (75% Methanol, 25% Eisessig) gewaschen. Schließlich wurde das in Fixierlösung suspendierte Kernmaterial auf eisgekühlte Objektträger getropft und durch Trocknen fixiert.

2.3.1. Nachweis des Y-Chromosoms

Durch Quinacrinfärbung nach Caspersson und Zech (1972) wurde in den präparierten Metaphasen die Präsenz bzw. Anzahl der Y-Chromosomen überprüft. Der Objektträger wurde 30 Minuten in Quinacrin-Lösung (5 mg in 100 ml Mc Ilvaine-Puffer: $0,1 \text{ M}$ Zitronensäure mit $0,2 \text{ M}$ Na_2HPO_4 auf $\text{pH } 7,0$ gebracht), 10 Minuten mit Mc Ilvaine-Puffer gespült und mikroskopisch auf die für das Y-Chromosom typische Fluoreszenzerscheinung getestet.

2.3.2. Karyogramm

Die Darstellung vollständiger Karyogramme erfolgte mit der G-Banden-Färbung nach Seabright (1971).

Hierzu wurden die präparierten Metaphasen über Nacht bei 60°C getrocknet, anschließend bis zu zwei Minuten in $0,0025\%$ Trypsin-Lösung (137 mM NaCl ; 21 mM Na_2HPO_4 ; $1,5 \text{ mM}$ KH_2PO_4 ; $\text{pH } 7,2$) inkubiert und mit Hanks' BBS-Lösung (Seromed, Berlin, BRD) gespült. Nach der Färbung in 5% iger Giemsa-Lösung (5% Giemsa-Stamm-lösung in 25 mM Na_2HPO_4 und 25 mM KH_2PO_4) für ca. 2 Minuten wurde der Objektträger mehrfach mit Wasser gespült und getrocknet.

Die Präparate wurden mit Xylol behandelt, nach Übersichtung (Eukitt, Kindler, Freiburg i.Br.) mit Deckgläschen versiegelt und in einem Zeiss Mikroskop Ultraphot II ausgewertet sowie fotografiert.

2.4. ZELLPRÄPARATION ZUR 2D-ANALYSE

Zellernte und Herstellung einzelner Zellfraktionen erfolgten bei ca. 90% Konfluenz im Anschluß an die unter 2.1.5. beschriebene, 20-stündige metabolische Markierungsphase. Alternativ ging eine sechsstündige Kultivierung in Wissler Medium ohne fötalem Kälberserum voraus, wenn die 2D-Proteinmuster mit Silberfärbung ausgewertet wurden.

Nach fünffachem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen nach zwei verschiedenen Protokollen (2.4.1. und 2.4.2.) aufgearbeitet.

Die erhaltenen Proteinfraktionen wurden entweder sofort in der zweidimensionalen Gelelektrophorese verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.4.1. Unfraktioniertes Zellmaterial

Zur Analyse des unfraktionierten Zellmaterials wurde der Monolayer vorsichtig mit einem Gummispatel aus der Kulturflasche gelöst und bei 200 g 10 Minuten abzentrifugiert. Je 1 mg Pellet wurden in 4 μl Elektrophorese-Lysepuffer (O'Farrell, 1975) suspendiert entsprechend folgender Endkonzentrationen in der Probe: 9,0 M Harnstoff; 5% Merkaptoäthanol; 2% Nonidet P40; 2% Ampholine (enthaltend 1,6% pH-Bereich 5-7 und 0,4% pH-Bereich 3,5-10; LKB, München). Die Zellsuspension wurde dreimal bei -80°C eingefroren und aufgetaut. Nach Abzentrifugieren des unlöslichen Materials bei 800g für 10 Minuten ergab sich im Überstand eine Proteinkonzentration von ca. $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, gemessen mit dem Proteinbindungstest (Bio-Rad, München), der auf der Nachweismethode von Bradford basiert (Bradford, 1976).

2.4.2. Tritonlösliche und zytoskeletale Proteine

Die tritonlöslichen und unlöslichen Zellfraktionen wurden in Anlehnung an eine Methode von Leavitt und Kakunaga (1980) voneinander getrennt:

Der Zellrasen wurde in der Kulturflasche mit eiskalter 1%iger Triton X-100 Lösung (10 mM Tris/HCl, pH 7,8; 30 mM KCl_2 ; 0,01 mM β -Merkaptoäthanol) überspült (200 $\mu\text{l}/\text{ca. } 1 \times 10^7$ Zellen). Anschließend wurde die Lösung gesammelt und bei 200 g 10 Minuten abzentrifugiert; dem Überstand wurden die Zutaten des Elektrophorese-Lysepuffers gemäß den angegebenen Endkonzentrationen zugegeben. Als tritonlösliche Fraktion wurde der Überstand bezeichnet, der nach einer weiteren Zentrifugation bei 800 g erhalten wurde. Der tritonresistente, in der Kulturflasche adherent verbliebene Zellanteil wurde mit 0,1%iger Triton X-100 Lösung gewaschen und mit einem Gummispatel vom

Substrat gelöst. Nach Zentrifugation bei 200 g für 10 Minuten wurde das Pellet wie für das unfractionierte Zellmaterial unter 2.5.1. beschrieben aufgearbeitet. Die zytoskeletalen Proteine sind im Überstand nach der Zentrifugation bei 800 g enthalten.

2.5. 2-D-GELELEKTROPHORESE

Die Proteinzusammensetzung der drei verschiedenen Zellfraktionen wurde durch die zweidimensionale Gelelektrophorese nach der Methode von O'Farrell (1975) mit geringen Modifikationen untersucht.

2.5.1. Lösungen

4%ige Polyacrylamid-Lösung: 4% Polyacrylamid (3,8% Polyacrylamid und 0,2% Bisacrylamid); 9,0 M Harnstoff; 2% (w/v) Nonidet P40; 3% Ampholine (2,4% pH-Bereich 5-7, 0,6% pH-Bereich 3,5-10; LKB, München)

Elektrophorese-Lysepuffer: 9,0 M Harnstoff; 5% β -Merkaptoäthanol; 2% (w/v) Nonidet P40; 2% Ampholine (1,6% pH-Bereich 5-7; 0,4% pH-Bereich 3,5-10).

Harnstoff-Lösung: 9,0 M Harnstoff; 1% Ampholine (0,8% pH-Bereich 5-7, 0,2% pH-Bereich 3,5-10)

Anodenpuffer: 0,01 M H_3PO_4

Kathodenpuffer: 0,02 M NaOH

Äquilibriumspuffer: 0,0625 M Tris/HCl, pH 6,8; 2,4% SDS; 10% Glycerin; 5% β -Merkaptoäthanol

30%ige Polyacrylamid-Lösung: 30% Polyacrylamid; 0,8% Bisacrylamid; 3% Glycerin

60%ige Polyacrylamid-Lösung: 60% Polyacrylamid; 1,6% Bisacrylamid; 6% Glycerin

1,5 M Tris-Lösung:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% SDS
0,5 M Tris-Lösung:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4% SDS
Elektrodenpuffer:	0,025 M Tris; 0,192 M Glycerin; 0,1% SDS
1%ige Agarose-Lösung:	1% Agarose in Äquilibrierpuffer

Alle Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

2.5.2. Erste Dimension

Die erste Dimension war eine Isoelektrofokussierung in Glaskapillaren (140 x 1,5 mm Durchmesser), die bis auf eine Auftragstelle von 30 mm mit 4%iger Polyacrylamid-Lösung gefüllt waren (Polymerisation der Gele mit 0,01% Ammoniumpersulfat und 0,07% N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin). Pro Lauf wurden 10 Kapillaren zwischen der oberen mit Kathodenpuffer und der unteren mit Anodenpuffer gefüllten Kammer einer Elektrophoreseapparatur (H.Hölzel, München) senkrecht angebracht.

Nach einem Vorlauf von drei aufeinanderfolgenden Viertelstunden bei Spannungen von 200 Volt, 300 Volt und 400 Volt mit 20 µl Elektrophorese-Lysepuffer pro Kapillare wurden je nach Zellfraktion Probenvolumina von 10 bis 60 µl aufgetragen: Bei radioaktiv markiertem Material waren die Auftragsmengen für unfractioniertes Zellmaterial 12 - 18 µl entsprechend 2×10^6 cpm, für tritonlösliche Proteine 40 - 60 µl entsprechend $1,5 \times 10^6$ cpm. Die Proben wurden mit je 10 µl Harnstoff-Lösung überschichtet. Der Hauptlauf erfolgte mit frischen Kathodenpuffer bei 400 Volt für 16 Stunden, 600 Volt für eineinhalb Stunden und abschließend einer Dreiviertelstunde bei 800 Volt. Die mit Druckluft aus den Kapillaren gelösten Rundgele wurden 10 Minuten in Äquilibrierpuffer bei 4°C äquilibriert und bei -80°C eingefroren oder sofort in der zweiten Dimension weiterverwendet.

2.5.3. Zweite Dimension

Die Auftrennung nach Größe der Proteine wurde in SDS-Polyacrylamid-Plattengelen (1,0 x 120 x 190 mm) durchgeführt.

Für radioaktives Material und anschließende fluorographische Auswertung wurde ein exponentieller Polyacrylamid-Gradient von 7,5% bis 20% verwendet: Die 7,5%igen und 20%igen Stammlösungen enthielten 30%ige Polyacrylamid-Lösung, 1,5 M Tris-Lösung und Wasser im Verhältnis 1 : 1 : 2 bzw. 60%ige Polyacrylamid-Lösung 1,5 M Tris-Lösung und Wasser im Verhältnis 1,32 : 1 : 1,68; die Polymerisation erfolgte mit 0,025% Ammoniumpersulfat und 0,1% N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin.

Für unmarkiertes Material, das durch Silberfärbung ausgewertet wurde, betrug der Konzentrations-Gradient 11% bis 13%: Die 11%igen und 13%igen Stammlösungen enthielten 30% Polyacrylamid-Lösung, 1,5 M Tris-Lösung und Wasser in den Verhältnissen 1,46 : 1 : 1,54, bzw. 1,72 : 1 : 1,28.

Mit Hilfe eines Gradienten-Mischgerätes wurden aus diesen Stammlösungen zwischen zwei Glasplatten Gel mit von oben nach unten ansteigender Polyacrylamid-Konzentration gegossen.

In beiden Fällen wurde über dem beschriebenen Trenngel ein 35 mm hohes Sammelgel angebracht: 30%ige Polyacrylamid-Lösung, 0,5 M Tris-Lösung und Wasser im Verhältnis 1 : 2,5 : 6,5.

Nach dem Äquilibrieren wurde jedes Rundgel mit 1%iger Agarose-Lösung auf einem Plattengel luftblasenfrei fixiert. Je zwei Gele wurden vertikal zwischen den beiden mit Elektrodenpuffer gefüllten Kammern der Elektrophorese-Apparatur befestigt; hierdurch war ein vergleichender Elektrophorese-Lauf zweier Proben unter exakt gleichen Bedingungen möglich. Die angelegte Spannung betrug für zwei Stunden 50 Volt, anschließend für ca. sechs Stunden 200 Volt. Durch die farblich deutliche Position von zusätzlich aufgetragenem Cytochrom c und Bromphenolblau wurde die Dauer des Laufs kontrolliert.

2.5.4. Bestimmung von isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht

Um den aufgetrennten Proteinen einen approximativen isoelektrischen Punkt zuzuordnen, wurde der in der ersten Dimension aufgestellte pH-Gradient ermittelt. Ein Rundgel, auf das entsprechendes Probenmaterial aufgetragen worden war, wurde im Anschluß an die Isoelektrofokussierung in 1 cm lange Stücke geschnitten, die in jeweils 0,5 ml zweifach destilliertem Wasser stark geschüttelt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen wurden. Nach 60-minütigem Entgasen wurde der pH-Wert jeder Lösung mit einem pH-Meter (Methrom, Herisau) festgestellt. Aus dem graphisch dargestellten pH-Gradienten, der die pH-Werte in Beziehung zur Entfernung der Gelstücke von der Auftragsstelle zeigt, wurde der pI-Wert eines Proteins entsprechend seiner Position im Gel abgelesen.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde auf das Plattengel der zweiten Dimension 10 Minuten nach Laufbeginn folgendes Eichprotein-Gemisch aufgetragen (alle Eichproteine von Boehringer, Mannheim): Albumin-Dimer 130 kD, Albumin-Monomer 68 kD (Rinderserum), Aldolase 43 kD (Kaninchenmuskel), Chymotrypsinogen A 25 kD, Cytochrom c 12 kD (Pferdeherz).

In einer Eichkurve wurden ihre Molekulargewichte (= MG) logarithmisch gegen ihre Wanderstrecke im Gel angetragen. Hieraus konnte das Molekulargewicht eines Proteins entsprechend seiner Entfernung von der Auftragsstelle ermittelt werden.

2.6. AUSWERTUNG DER 2D-ANALYSE

2.6.1. Fluorogramme

Radioaktiv markierte Proteine wurden mit der Methode der Fluorographie in Anlehnung an eine Arbeit von Bonner und Laskey (1974) sichtbar gemacht. Die Wirkung der β -Strahlung von Tritium wird dabei durch eine fluoreszierende Überträgersubstanz (Fluor) potenziert: durch ein zerfallendes β -Partikel im Gel werden mehrere Photonen freigesetzt, die die lokale Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilmes bedingen.

Im Anschluß an die 2D-Elektrophorese wurden die Gele nach 30-minütiger Fixierung (30% Methanol, 10% Essigsäure) hierzu 90 Minuten in Enhancer (New England Nuclear, Dreieich, BRD) inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit eiskaltem Wasser für 30 Minuten.

Die Gele wurden bei 80°C unter Vakuum im Gelrockner 60 Minuten getrocknet. Anschließend wurden Röntgenfilme (Kodak X-AR 5) aufgelegt und je nach Radioaktivität der untersuchten Probe für 14 bis 21 Tage bei -70°C exponiert.

2.6.2. Silberfärbung

Zur Darstellung des unmarkierten Zellmaterials wurde die Silberfärbung nach der Vorschrift von Ansorge (1983) durchgeführt. Bei dieser Färbemethode lagern sich Silberionen an die Proteine im Gel an, wodurch ihre Reduktion zu metallischem Silber auf noch nicht geklärte Art und Weise (Merril und Goldman, 1984) erleichtert wird.

Die Gele wurden unmittelbar nach der 2D-Elektrophorese nacheinander in folgenden Lösungen vorsichtig geschwenkt:

- | | |
|--|---------------|
| 1) 50% Methanol, 12% Trichloressigsäure, 2% CuCl ₂ , 1% ZnCl ₂ | (20 Minuten) |
| 2) 10% Äthanol, 5% Essigsäure | (15 Minuten) |
| 3) 0,01% KMnO ₄ | (10 Minuten) |
| 4) 10% Äthanol, 5% Essigsäure | (10 Minuten) |
| 5) 10% Äthanol | (10 Minuten) |
| 6) H ₂ O | (10 Minuten) |
| 7) 0,11% AgNO ₃ | (10 Minuten) |
| 8) H ₂ O | (10 Sekunden) |
| 9) 10% K ₂ CO ₃ | (1 Minute) |

Alle Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt, um Farbartefakte an der Geloberfläche zu vermeiden.

Die Entwicklung der Färbung erfolgte mit 2% K₂CO₃ und 0,01% Formaldehyd bis zur optimalen Intensität der Proteinspots (ca. 10 Minuten) und wurde gestoppt mit einer Lösung aus 10% Methanol und 5% Essigsäure.

2.6.3. Vergleich der 2D-Proteinmuster

Für die verschiedenen Fraktionen jeder untersuchten Zelllinie wurde je ein repräsentatives Gel ausgewählt. Die vergleichende Analyse erfolgte durch visuelle Auswertung: Die Autoradiographien fluorographisch dargestellter Muster sowie die mit Silber angefärbten Gele wurden paarweise aufeinandergelegt. Quantitative und qualitative Varianten aller abgebildeten Spots wurden markiert; solche, die bei mehreren entsprechenden Präparationen gleicher Zelllinien nicht kontinuierlich auftraten, wurden als Zellkultur- oder Präparationsartefakt abgezogen. Konzentrationsunterschiede, die weniger als etwa der zweifachen Intensität eines Spots entsprachen, wurden nicht berücksichtigt; sie waren mit bloßem Auge nicht eindeutig erfaßbar und konnten Zelllinien-un-spezifisch auftreten. Offensichtliche Spot-Verschiebungen wurden in jedem der beiden Muster als zusätzliche Spots markiert.

Die quantitativen und qualitativen Spot-Varianten jedes Vergleichspaares wurden in Schemata auf Klarsichtfolien dargestellt, in den gewählten repräsentativen Mustern jeder Zelllinie überprüft und in Listen zusammengestellt.

2.7. IMMUNPRÄZIPITATION

Zur H-Y spezifischen Immunpräzipitation wurden H-Y Antiseren aus der Maus verwendet. Sie wurde im homologen System mit Lymphozyten aus weiblichen und männlichen Tieren des Maus-Inzuchtstammes C57Bl/6J (Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover) durchgeführt.

2.7.1. Lymphozytenaufbereitung

Aus den Mäusen wurden die Milzen entnommen, durch ein feines Stahlsieb gedrückt, und die dabei gewonnenen Zellen und Organteile in PBS suspendiert. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die Lymphozyten isoliert: Die Suspension jeder Milz wurde auf 3 ml Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg) geschichtet und bei 15°C mit 400 g 30 Minuten zentrifugiert; die entstandene Interphase wurde nach drei Wasch-Schritten in PBS aufgenommen (2×10^7 Zellen/1 ml PBS).

Zur autoradiographischen Auswertung wurden die gewonnenen Lymphozyten metabolisch markiert. Hierzu wurden sowohl Kurzzeit- als auch Langzeit-Kulturen mit sechs- bzw. neunzehnstündiger Markierungsphase bei 37°C durchgeführt.

Pro 2×10^7 Zellen wurden 0,250 mCi ^3H -Leuzin (L-[3,4,5- ^3H (N)]-Leuzin, spezifische Aktivität 152 Ci/mmol, New England Nuclear, Dreieich, BRD) in 4 ml leuzinfreiem RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum sowie Concanavalin A (5 µl/ml) zugegeben. Alternativ erfolgte eine Markierung mit 50 µCi ^{35}S -Methionin (L-[^{35}S]-Methionin, spezifische Aktivität >800 Ci/mmol, Amersham Buchler, Braunschweig) pro 2×10^7 Zellen in methioninfreiem RPMI Medium (Biochrom Berlin, BRD) mit 5% fötalem Kälberserum und Concanavalin A (5 µl/ml).

Eine grobe Plasmamembran-Präparation aus den Lymphozyten wurde durch Detergenzbehandlung (Inkubation mit 0,5% Nonidet P40 für 30 Minuten) und Ultrazentrifugation (13000 Upm für 20 Minuten, Rotor Ti 75, Beckman) erreicht. Der Überstand wurde für die Immunpräzipitation verwendet.

2.7.2. H-Y Antiseren

Die polyklonalen H-Y Antiseren wurden von C57Bl/6J Mäusen in unserem Laboratorium gewonnen. Hierzu wurden wöchentlich 3×10^7 männliche Milzzellen aus C57Bl/6J Mäusen in weibliche Tiere intraperitoneal injiziert. 10 Tage nach der sechsten Immunisierung wurde das Antiserum entnommen.

Das monoklonale H-Y Antiserum (Nr. 12-49-29; 1/14/80) wurde freundlicherweise von Dr. G. Koo (Sloan-Kettering Institute, New York) zur Verfügung gestellt.

2.7.3. Immunadsorbtionschromatographie

Die Plasmamembran-Fraktion der Mauslymphozyten (ca. 2×10^7 Zellen) wurden zunächst präinkubiert mit aktivierter Protein A-Sepharose 4B (10%ig, Pharmacia, Freiburg), an die nicht-immunes weibliches Mausserum gekoppelt war. Durch diese Voradsorbtion wurde unspezifisch an der Sepharose-Säule oder an Komponenten des Antiserums haftendes Material aus der Fraktion entfernt.

Die spezifische Immunpräzipitation erfolgte in Anlehnung an die Methode von Hall et al. (1981). An 100 µl 10%ige aktivierte Protein A-Sepharose 4B in PBS wurden durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur 100 µl H-Y Antiserum (gereinigt durch Zentrifugation bei 2800 Upm für 30 Minuten, Rotor Ti 75, Beckman) gekoppelt. Nach dreifachem Waschen der Sepharose mit PBS wurde sie zusammen mit der präinkubierten Plasmamembran-Fraktion eine Stunde bei Raumtemperatur und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Der an Protein A gekoppelte Antikörper-Antigen-Komplex wurde nach dreimaligem Waschen durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C in Lysepuffer (10% Glycerin, 0,125 M Tris/HCl, pH 8,0) in Gegenwart von 5% β-Merkaptoäthanol und 2,3% SDS eluiert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte die Zentrifugation der Sepharose bei 100 g für 5 Minuten.

Da nur Antikörper der Immunglobulin-Klasse G direkt an Protein A-Sepharose haften (Goding, 1978) wurde das Protokoll für das monoklonale IgM Antikörper enthaltende Antiserum modifiziert:

Durch aufeinanderfolgende Inkubationen wurde ein Sandwich-Komplex aus Komponenten der voradsorbierten Plasmamembran, dem monoklonalen Antikörper und einem Kaninchen-IgG-Antikörper gegen Maus-IgM Antikörper gebildet, der schließlich mit aktivierter Protein A-Sepharose inkubiert wurde.

2.7.4. 1D-Gelelektrophorese

Die Eluate wurden mit der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit einem Konzentrationsgradienten des Polyacrylamids von 7,5% bis 15% im Plattengel aufgetrennt.

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte wie unter 2.5.4. beschrieben. Tritium-markierte Proteine wurden fluorographisch (siehe 2.6.1.) dargestellt; bei ^{35}S -Markierung wurden die Gele ohne vorherige Enhancer-Inkubation getrocknet. Die Röntgenfilme wurden bis zu zwei Monaten bei -70°C exponiert.

Bei unmarkiertem Material wurde eine Silberfärbung der Gele nach der Vorschrift von Sammons et al. (1981) durchgeführt.

3. E R G E B N I S S E

3.1. ZELLKULTUR

3.1.1. Wachstum der Fibroblasten

Alle untersuchten Zelllinien wiesen in Kultur die für Fibroblasten typische spindelförmige Morphologie mit langgestreckten Faser-Strukturen auf. Die meisten Kulturen enthielten Zellen von vergleichbarer Größe; in wenigen Fällen wurden überdurchschnittlich große Zellen mit breitem Zellkörper und sehr langsamem Wachstum festgestellt, die zur 2D-Analyse nicht verwendet wurden.

Frisch ausgesäte abgerundete Zellen wuchsen in einem Zeitraum von ca. 10 Stunden wieder am Substrat fest und entwickelten die beschriebene fibroblastoide Morphologie. Mitotische Zellen, im Phasenkontrastmikroskop als abgerundet und besonders lichtintensiv zu erkennen, wurden ab dem ersten Tag nach der Aussaat festgestellt.

Das Zellwachstum zeigte entsprechend den Charakteristika von Primär-Zelllinien das Phänomen der Kontakthemmung: Sobald eine Zelldichte im Monolayer erreicht war, bei der die einzelnen Fibroblasten in engem Zell-Zell-Kontakt vorlagen, war das Zellwachstum verlangsamt und schließlich beendet. In dieser Phase wurden die Zellen gemäß ihrer Verdoppelungsrate am dritten bis fünften Tag nach der Aussaat passagiert: Für einzelne Zelllinien wurde dieses Wachstum mit normaler Teilungsrate kontinuierlich bis zu 50 Passagen lang nachgewiesen.

Morphologisch waren Fibroblasten mit normalem und solche mit gonosomal aberrantem Karyotyp nicht zu unterscheiden. Die Teilungsrate der Zelllinien mit fehlenden oder zusätzlichen Geschlechtschromosomen war in manchen Fällen ein bis zwei Tage langsamer als für normale Fibroblasten üblich, was sich aber für die einzelnen Karyotypen nicht verallgemeinern ließ.

Lungenfibroblasten hatten gegenüber allen Fibroblasten aus Hautbiopsien bei ähnlicher Zellform ein geringeres Zellvolumen und eine schnellere Verdoppelungsrate.

Die Morphologie klonierter Zellen war vergleichbar mit der ihrer Stamm-Zelllinie vor der Klonierung; ihre Teilungsrate allerdings war in vielen Fällen um ein bis vier Tage verlangsamt.

3.1.2. Ernte der Fibroblasten

Kulturen mit vergleichbarem Wachstumsverhalten wurden nach insgesamt 10 bis 15 Passagen zur Ernte vorbereitet: Bei 80 bis 90% Konfluenz des Monolayers, die meist am dritten oder am vierten Tag nach der letzten Passage erreicht war, wurden die Zellen 20 Stunden lang metabolisch markiert oder für die Auswertung durch Silberfärbung sechs Stunden in Wissler Medium inkubiert.

Zuvor erfolgte durch kontrollierte Zugabe von Kulturmedien indirekt eine grobe Synchronisation des Zellzyklus der Fibroblasten: Der letzte Wechsel des Kulturmediums wurde drei Tage vor der Verarbeitung der Zellen durchgeführt. So mußte zu Beginn der radioaktiven Markierung auf Grund der erschöpften Nährstoffe im Medium ein großer Teil der Zellen in der G_0 -Phase ihres Zellzyklus vorliegen. Mikroskopisch wurden nur selten mitotische Zellen festgestellt.

Durch erneute Nährstoffzugabe im Markierungsmedium wurde der Zyklus wieder gestartet, so daß diese Zellen bei ihrer Ernte am Ende der Markierungszeit zumindest die G_1 -Phase und vermutlich auch die S-Phase durchlaufen hatten.

Die alternativ zur metabolischen Markierung angewendete Phase in Wissler Medium ohne fötalem Kälberserum bedeutete für die Zellen einen fortgesetzten Nährstoffmangel. Diese Zellen mußten im Gegensatz zu den radioaktiv markierten weiterhin in der G_0 -Phase des Zellzyklus stehengeblieben sein.

Die mikroskopische Überprüfung ergab keine wesentlichen Änderungen der Zellmorphologie während der beiden Vorbereitungsphasen der Zellernte.

Pro Fibroblasten-Zelllinie wurden für jede Präparation etwa 5×10^6 Zellen entsprechend einem Gewicht des gesamten Zellpellets von ca. 40 mg geerntet.

Für das totale Zellprotein betrug der Einbau von Tritium-markierten Leuzin nach Solubilisierung in Elektrophorese-Lysepuffer und Abzentrifugieren von Kernen und unlöslichem Material im Mittel $2,0 \times 10^7$ cpm.

Für die aus den adherenten Fibroblasten solubilisierter tritonlöslicher Proteinfraction wurde ein Einbau an Radioaktivität von durchschnittlich $2,5 \times 10^7$ cpm pro Zellernte ermittelt. Die in der Kulturflasche verbliebenen Kerne und fibrillären Strukturen ergaben nach Ablösung und Zentrifugation ein Pellet von etwa 25 mg. Hieraus wurden durch Solubilisierung in Elektrophorese-Lysepuffer die zytoskeletalen Proteine mit einer Gesamtradioaktivität von durchschnittlich $7,5 \times 10^6$ cpm gewonnen.

3.2. DARSTELLUNG DES UNFRAKTIONIERTEN ZELLMATERIALS

Entsprechend dem angewendeten Verfahren (siehe 2.4.1.) war in dieser Präparation aus geernteten Fibroblasten der größte Anteil des gesamten Zellproteins enthalten; ausgenommen waren lediglich Zellkerne sowie solche Komponenten, die bei Anwendung des nichtionischen Detergenz Nonidet P40 zusammen mit hohen Harnstoff-Konzentrationen und β -Merkaptoäthanol nicht in Lösung gebracht werden können.

Zur vergleichenden Analyse dieser Proteingemische von verschiedenen Zelllinien wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese die Proteinmuster der Präparate dargestellt. Für jeden Elektrophorese-Lauf erfolgte die Ermittlung des entstandenen pH-Gradienten und die Bestimmung der Molekulargewichte nach den unter 2.5.4. beschriebenen Verfahren. Um die mit der Analyse erfaßten Anzahl von Proteinen zu erweitern, wurden von jeder Zelllinie Präparate sowohl von metabolisch markierten als auch von nicht markierten Kulturen hergestellt, deren Proteinmuster autoradiographisch bzw. durch Silberfärbung ausgewertet wurden.

3.2.1. Autoradiographie

Für jedes 2D-Proteinmuster wurde in der 2D-Gelelektrophorese die Proteinmenge aufgetragen, die einer Radioaktivität an eingebautem Tritium-Leuzin von 2×10^6 cpm entsprach.

In der zweiten Dimension wurde ein kontinuierlicher Konzentrationsgradient von 7,5% bis 20% verwendet.

Anschließend an die elektrophoretische Trennung wurden Röntgenfilme auf den fertigen Gelen solange exponiert, bis eine für alle Proben vergleichbare Intensität verschiedener Referenz-Spots im 2D-Muster erreicht war; die Expositionszeit betrug im Mittel 18 Tage.

Das totale Zellprotein ergab ein komplexes 2D-Proteinmuster von bis zu 600 differenzierbaren Proteinflecken (= Spots) mit unterschiedlicher Intensität und Größe (Abb. 1). Es wurden Polypeptide dargestellt, deren isoelektrische Punkte zwischen 4,5 und 7,0 lagen; ihre Molekulargewichte betrugen zwischen ca. 180 kD und 12 kD.

Proteinflecken, die sich von der üblichen, ellipsoiden Form und Größe der Spots unterschieden, enthalten mindestens zwei Proteine mit sehr ähnlichen pI- und MG-Werten, die unter den gegebenen Bedingungen der 2D-Gelelektrophorese nicht vollständig voneinander getrennt werden.

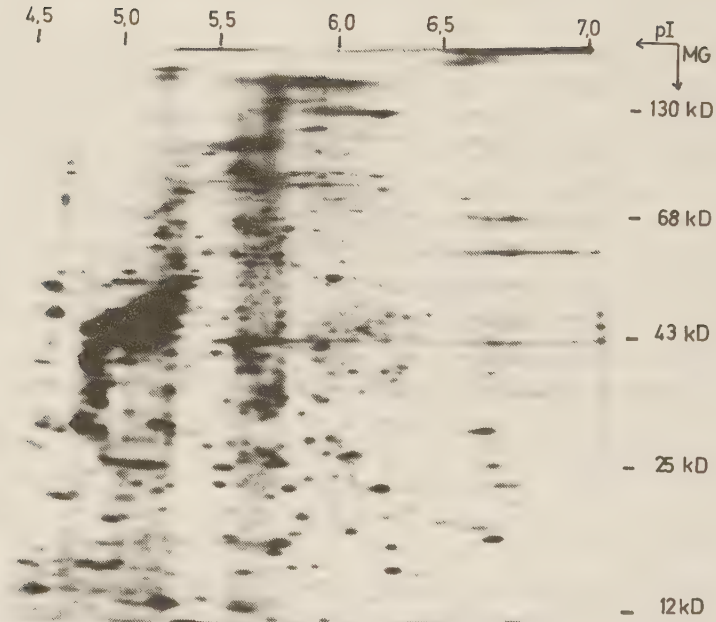


Abb. 1: Autoradiographische Darstellung des 2D-Proteinmusters von metabolisch radioaktiv markiertem unfractioniertem Zellmaterial einer humanen Fibroblasten-Zelllinie. A kennzeichnet Aktin.

Der größte Anteil der Proteine lag im Bereich 6,4 bis 4,8 des pH-Gradienten mit Molekulargewichten zwischen 70 kD und 20 kD. Im pH-Bereich 6,4 bis 7,0 waren verhältnismäßig wenig Proteine erkennbar, deren Spots, verglichen mit denen im übrigen Proteinmuster, horizontal ausgedehnter waren.

Proteine mit Molekulargewichten über 80 kD traten häufig als Spot-Reihen auf: Sie werden gebildet durch mehrere benachbarte Polypeptide mit aufeinanderfolgenden pI-Werten, deren Molekulargewichte identisch oder geringfügig vermindert sind.

Durch überdurchschnittliche Intensität und Größe zeichnete sich eine Gruppe von Protein-Spots mit pI-Werten zwischen 4,8 und 5,6 im Molekulargewichtsbereich zwischen 53 kD und 30 kD aus. Viele dieser Proteine konnten dem Zytoskelett der Fibroblasten zugeordnet werden und sind unter 3.3. näher beschrieben. Eine deutlichere Auflösung der einzelnen Komponenten dieses Komplexes wurde erreicht durch starke Verdünnung des Probenmaterials und geringe Expositionszeiten der Röntgenfilme. Zugunsten der im Rahmen der vorliegenden Fragestellung relevanten schwächeren Spots im übrigen Pro-

teinmuster wurde bei der vergleichenden Analyse des totalen Zellproteins auf diese Möglichkeit verzichtet.

Auffallend stark vertreten war ein Spot mit einem pI-Wert um 5,6 und einem Molekulargewicht von 42 kD. Er konnte durch Coelektrophorese nach einem Verfahren von Leavitt und Kakunaga (1980) als Aktin, eine der Hauptkomponenten des Zellproteins, identifiziert werden: Einem radioaktiv markierten Proteingemisch wurde vor der elektrophoretischen Auftrennung unmarkiertes α -Aktin aus Kaninchenmuskel als Referenzprotein im Überschuß zugegeben. Vor der Exposition des Röntgenfilms wurde das Gel mit Coomassie-Blue angefärbt, wodurch markiertes und unmarkiertes Protein dargestellt wird. Aktin war mit den angegebenen Parametern erheblich stärker als ohne Referenzprotein sichtbar. Die anschließende Autoradiographie zeigte eine Verdrängung des radioaktiven Zellaktins durch das Referenzprotein in Form einer horizontalen Spot-Verschiebung. Bei starker Verdünnung des Probenmaterials konnten im identifizierten Spot zwei Proteine, gemäß den Literaturangaben (zusammengefaßt bei Leavitt u. Kakunaga, 1980) als β - und γ -Aktin bezeichnet, differenziert werden; sie zeigten bei gleichem Molekulargewicht wenig unterschiedliche pI-Werte.

Unmittelbar im Anschluß an Aktin wies der pH-Bereich von 5,3 bis 5,6 im Vergleich zum übrigen 2D-Proteinmuster einige Proteine von durchschnittlicher Konzentration, aber kaum Spots mit geringer Intensität auf. Diese Lücke im Proteinmuster steht möglicherweise in Zusammenhang mit der hohen Konzentration an Aktin in der Probe.

3.2.2. Reproduzierbarkeit der Proteinmuster

Die Auftrennung ein und desselben Präparates in unterschiedlichen Läufen der 2D-Gelelektrophorese ergab eine gute Übereinstimmung der Proteinmuster.

Horizontale Verschiebungen und Intensitätsänderungen von Spots im pH-Bereich über 6,4 waren, bedingt durch kathodischen Drift in der ersten Dimension, möglich.

In einzelnen Fällen wurden Veränderungen der Position von Protein-Spots beobachtet. Hierbei handelte es sich meist um Reduktionen des Molekulargewichtes oder die Auftrennung eines Spots in zwei Komponenten mit unterschiedlichen pI- und/oder MG-Werten.

Die beschriebene Lücke des pH-Bereiches von ca. 5,3 bis 5,6 schien solche Variationen, ebenso wie Änderungen der Intensität von Spots zu begünstigen.

Im Molekulargewichts-Bereich über 80 kD war eine unterschiedliche Länge oder Form von Spot-Reihen möglich, die durch die Präsenz, den pI-Wert oder das Molekulargewicht der einzelnen enthaltenen Polypeptide begründet war. Die Auflösung solcher Proteinflecken in differenzierbare Spots war unterschiedlich deutlich.

Der Vergleich von zwei Präparaten, die unabhängig voneinander aus zwei metabolisch markierten Kulturen derselben Zelllinie gewonnen wurden, zeigte größere Variationen der 2D-Proteinmuster.

Auffällig waren Unterschiede der starken Spots im pH-Bereich 4,8 bis 5,6. So konnten zum Beispiel die beiden Proteine mit einem pI-Wert 5,3 und Molekulargewichten von 53 kD bzw. 51 kD gegenüber ihrer Darstellung in Abb. 1 schwächer, sehr viel stärker, oder als horizontal verdoppelte Spots auftreten.

Im übrigen Proteinmuster wurden die für die Reproduzierbarkeit in unterschiedlichen Elektrophorese-Läufen beschriebenen Varianten gefunden. Daneben wurden vereinzelt zusätzliche oder fehlende Spots mittlerer bis geringer Intensität festgestellt.

Die Differenzen solcher 2D-Proteinmuster könnten durch Zellwachstum bedingte Unterschiede widerspiegeln, insbesondere im Hinblick auf die varianten Proteine mit pI-Werten von 4,8 bis 5,6, die den zytoskeletalen Proteinen zuzurechnen sind. Für Spots mit geringer Intensität sind Präparations-Artefakte nicht auszuschließen.

3.2.3. Silberfärbung

Die 2D-Proteinmuster von nicht markiertem unfraktioniertem Zellmaterial wurden durch Silberfärbung der Gele dargestellt; die in der 2D-Elektrophorese aufgetragene Proteinmenge entsprach der für autoradiographisch ausgewertete Muster.

Der kontinuierliche Gradient der Polyacrylamid-Konzentration in der zweiten Dimension betrug 11% bis 13%.

Nach Silberfärbung wies das 2D-Proteinmuster eine Summe von 400 bis 450 Spots auf, die sich farblich vom gelblichen Gel-Hintergrund abhoben.

Das Muster war vergleichbar mit dem unter 3.2.1. beschriebenen Muster der entsprechenden autoradiographischen Darstellung (Abb. 1). Es zeigte eine ähnliche Verteilung von Proteinen mit pI-Werten von 4,5 bis 7,0 im pH-Gradienten des Gels.

Die Molekulargewichte der mit dieser Analyse erfaßten Proteine betrugen zwischen maximal 150 kD und 15 kD.

Durch diese Methode der Silberfärbung nach Ansorge erhalten die Proteinflecken je nach Konzentration und Charakter des Proteins unterschiedliche Farbtöne von braun über grau, orange bis gelb. Manche Polypeptide waren als hellgelbe Spots gegen den Gel-Hintergrund nur schwach zu differenzieren und werden in der Schwarz-Weiß-Fotographie nicht abgebildet. In seltenen Fällen waren sie, heller als der Hintergrund, als Negativspots sichtbar (siehe Abb. 13, unten; Spot am unteren Rand des Gels).

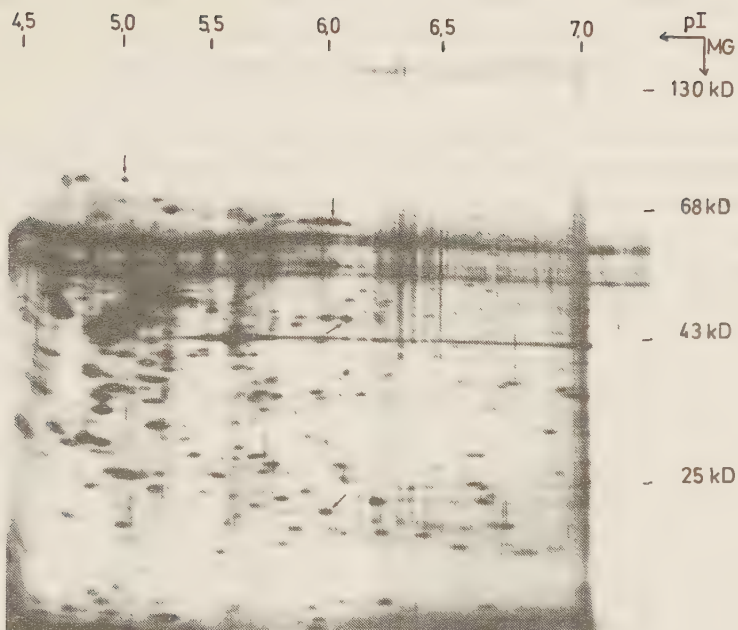


Abb. 2: Darstellung des unfractionierten Zellmaterials einer humanen Fibroblasten-Zelllinie durch Silberfärbung. Erläuterung der Pfeile unter 3.2.4.

Bei der Beurteilung von Konzentrationsunterschieden wurde berücksichtigt, daß sich die größere Menge eines Proteins nicht zwingend in einer intensiveren, sondern ebenso in einer helleren oder anderen Färbung des Spots äußern konnte.

Unabhängig von der präparierten Zelllinie fehlte wie in Abb. 2 in einigen Fällen die Anfärbung von Proteinen im MG-Bereich über 80 kD, die in der Autoradiographie hauptsächlich als Spot-Reihen dargestellt waren. Die erfolgreiche Anfärbung dieser schwach konzentrierten Proteine zum Beispiel in Abb. 13 (unten) zeigt, daß es sich hierbei um ein Problem der Färbetechnik handelt. Sie erwies sich als extrem sensibel gegenüber geringsten Schwankungen von Temperatur und Reinheitsgrad der Lösungen im gesamten System der 2D-Gelelektrophorese und des Färbeverfahrens.

Im Molekulargewichtsbereich zwischen 57 kD und 51 kD wurde die Identifizierung einzelner Proteine durch zwei starke und zwei schwache, durchgehend angefärbte, horizontale Banden erschwert. Sie waren zurückzuführen auf die Anwendung von

β -Merkaptoäthanol zur Solubilisierung von Proben, die in Anwesenheit von SDS aufgetrennt wurden. Die Begründung für diesen, nur nach Anfärbung mit Silber oder Coomassie-Blue auftretenden Artefakt steht in Einklang mit den Beobachtungen von Tasheva und Dessev (1983).

Die Reproduzierbarkeit der Proteinmuster für zwei verschiedene Elektrophorese-Läufe desselben Präparates entsprach den unter 3.2.2. beschriebenen Ergebnissen. Die Anzahl variierender Spots in den 2D-Mustern zweier Präparate derselben Zelllinie war im Durchschnitt höher als bei den autoradiographisch ausgewerteten Muster.

Zusätzlich waren farbliche Variationen für die Proteinflecken auf Grund der hohen Temperatursensibilität der Silberfärbung, sowie das Fehlen von Proteinen im Molekulargewichtsbereich über 75 kD möglich.

3.2.4. Vergleich der 2D-Muster nach Autoradiographie und Silberfärbung

Für die beiden Darstellungsmethoden wurden Zellen verwendet, die sich entsprechend ihrer Vorbehandlung in Kultur durch ihre Zellzyklus-Phasen unterschieden (siehe 3.1.2.). Durch Autoradiographie (Abb. 1) und Silberfärbung (Abb. 2) wurden vergleichbare, für unfractioniertes Zellmaterial charakteristische 2D-Proteinmuster erhalten.

Die autoradiographische Auswertung erfaßte eine größere Anzahl an Proteinen durch höhere Sensibilität für schwach ausgeprägte Spots, durch den steileren Polyacrylamid-Gradienten der zweiten Dimension von 7,5% bis 20% und die zuverlässigere Abbildung der Proteine im Molekulargewichtsbereich über 75 kD.

Der für die Silberfärbung gewählte flachere Polyacrylamid-Gradient von 11% bis 13% ergab eine stärkere Auftrennung von Proteinen mit geringen Größenunterschieden im Molekulargewichtsbereich unter 30 kD.

Die Reproduzierbarkeit für Silber-gefärbte Muster war geringer als für autoradiographisch ausgewertete, was unter anderem auch durch färbetechnische Besonderheiten begründet war.

Einzelne Spots waren in beiden Darstellungen bezüglich der Präsenz oder Intensität zu unterscheiden.

So wurden zum Beispiel durch Silberfärbung Proteine mit den isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten 5,0/75 kD, 6,1/45 kD und 6,0/60 kD zusätzlich angefärbt; andere wie zum Beispiel das mit pI 5,9 und 22 kD waren stärker abgebildet (siehe Pfeile in Abb. 2).

Andererseits wurden durch die Autoradiographie einige Proteine vor allem im niedermolekularen Bereich, wie zum Beispiel die mit den isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten 5,7/34 kD und 5,8/18 kD intensiver oder wie bei 5,6/28 kD und 6,1/27 kD zusätzlich dargestellt.

Eine umfassende Analyse solcher Proteine, die radioaktives ^3H -Leuzin nicht, weniger oder überdurchschnittlich stark einbauen, ist nur durch Silberfärbung und Autoradiographie desselben Gels möglich, unter Ausschluß der für die beiden Darstellungen unterschiedlich gewählten Protokolle der Zellkultur und 2D-Elektrophorese. Da hierzu eine aufwendige Auswaschung des Silbers nötig ist, das die radioaktive Strahlung eines Spots absorbieren würde, wurde sie nur in Einzelfällen durchgeführt. Die Ergebnisse sind unter 3.6. für klonierte Zelllinien beschrieben.

3.3. DARSTELLUNG DER ZELLFRAKTIONEN

Die Präparation der Zellfraktionen erfolgte nach metabolischer Markierung mit ^3H -Leuzin (siehe 2.4.1.). Bei klonierten Zelllinien wurde daneben unmarkiertes Zellmaterial für die Auswertung durch Silberfärbung verarbeitet.

Das Auslösen der tritonlöslichen Zellfraktion durch das unter 2.4.2. beschriebene Verfahren wurde mikroskopisch überprüft: Nach Behandlung des Zell-Monolayers (Abb. 3) mit 1%iger Triton X-100 Lösung blieben die Zellkerne anscheinend durch fibrilläre Strukturen am Boden der Kulturflasche fixiert (Abb. 4).

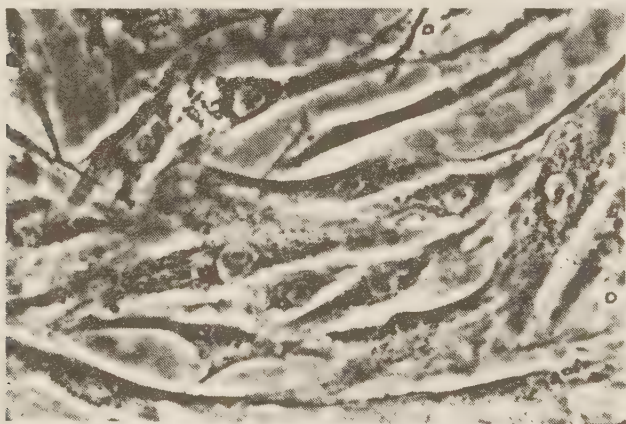


Abb. 3: Humane Fibroblasten als Monolayer in Zellkultur. (Vergrößerung x 380)

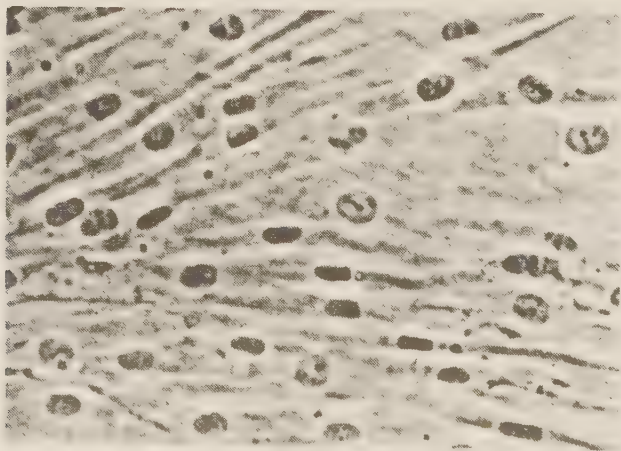


Abb. 4: Zellkerne und Zytoskelett der Fibroblasten nach Triton X-100 Behandlung.

3.3.1. Tritonlösliche Proteine

Zur Analyse der in 1%iger Triton X-100 Lösung solubilisierbaren Proteinfraction der Zellen wurde in der 2D-Gelelektrophorese die Proteinmenge aufgetragen, die einer eingebauten Radioaktivität von $1,5 \times 10^6$ cpm an ^3H -Leuzin entsprach; der Polyacrylamid-Konzentrationsgradient der zweiten Dimension betrug 7,5% bis 20%. Die Röntgenfilme wurden durchschnittlich 14 Tage exponiert.

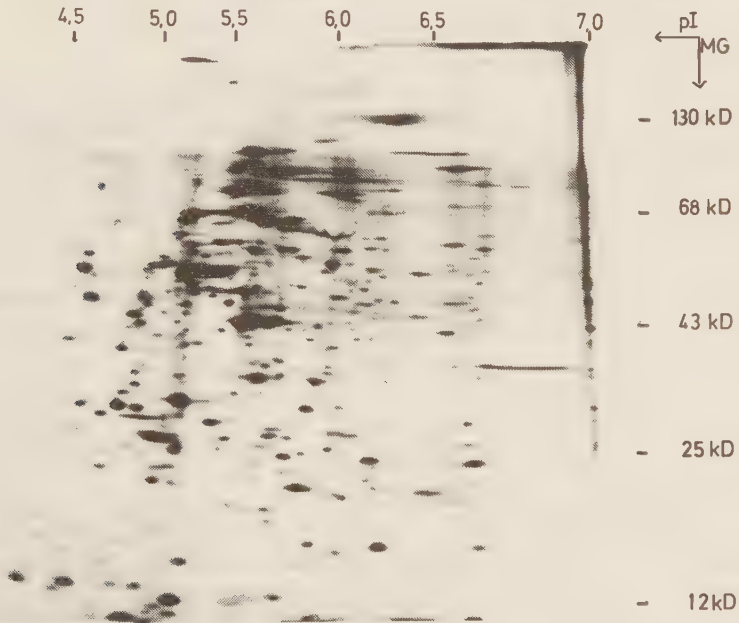


Abb. 5: Autoradiographische Darstellung des 2D-Proteinmusters der tritonlöslichen Proteine einer humanen Fibroblasten-Zelllinie.

Das 2D-Proteinmuster der tritonlöslichen Zellfraction (Abb. 5) ergab bis zu 480 differenzierbare Proteinflecken von unterschiedlicher Größe, Form und Intensität mit isoelektrischen Punkten zwischen 4,5 und 6,8 und Molekulargewichten zwischen 180 kD und 12 kD.

Im Bereich der pI-Werte von 6,3 bis 6,6 sowie in dem Molekulargewichtsbereich über 100 kD waren wenige Proteine vorhanden.

Den größten Anteil intensiver Spots ergaben Polypeptide mit Molekulargewichten zwischen 100 kD und 22 kD im pH-Gradienten-Bereich um 4,9 bis 6,0.

Proteine mit Molekulargewichten über 68 kD waren meist als Spot-Reihe abgebildet, die eine verschiedene Anzahl zum Teil differenzierbarer Einzelkomponenten mit aufeinanderfolgenden pI-Werten und gleichen oder gering verschiedenen Molekulargewichten enthielt.

Mit einem Molekulargewicht von 42 kD wurde im pI-Bereich 5,6 bis 5,8 Aktin identifiziert. Im Anschluß zeigte die Region der pI-Werte zwischen 5,3 und 5,6 verhältnismäßig wenig Proteine mit Molekulargewichten unter 42 kD.

Drei gegen den Hintergrund helle Spots mit einem Molekulargewicht von 59 kD und pI-Werten von 5,9 bis 6,1 erwiesen sich durch Vergleich mit Silberfärbung als Polypeptide, die offenbar durch die metabolische Markierung nicht erfaßt werden.

3.3.2. Zytoskeletale Proteine

Als zytoskeletale Zellfraktion wurde das Material bezeichnet, das mit Elektrophorese-Lysepuffer aus den in der Kulturflasche verbliebenen und pelletierten Zellstrukturen solubilisiert wurde.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurde eine Proteinmenge entsprechend der Radioaktivität von 2×10^6 cpm und in der zweiten Dimension ein Polyacrylamid-Gradient von 7,5% bis 20% verwendet. Die Expositionszeit betrug im Mittel 14 Tage.

Im Proteinmuster der zytoskeletalen Zellfraktion (Abb. 6) waren ca. 150 Proteinflecken von stark unterschiedlicher Intensität enthalten. Die Proteine hatten pI-Werte zwischen 4,5 und 7,0 und Molekulargewichte zwischen 140 kD und 12 kD; sie lagen größtenteils in einem Bereich von 4,6 bis 6,3 des pH-Gradienten mit Molekulargewichten zwischen 68 kD und 25 kD.

Dominierende Spots waren ca. 15 Komponenten mit pI-Werten zwischen 4,7 und 5,7 und Molekulargewichten zwischen 55 kD und 29 kD. Die zytoskeletalen Fraktionen aller Zelllinien zeigten in dieser Region neben Aktin (5,6 - 5,7/42 kD) die Proteine mit den pI-Werten und Molekulargewichten 5,3/52 kD; 5,3/50 kD; 5,2/49 kD; 5,1/48 kD; 5,0/46 kD; 4,9/45 kD; 4,85/42 kD; 4,8/38 kD; 4,85/36 kD; 4,85/34 kD; 4,75/32 kD; 4,8/31 kD; 4,7/31 kD; 4,8/30 kD.

Spot-Reihen entstanden für die meisten Proteine über 68 kD.

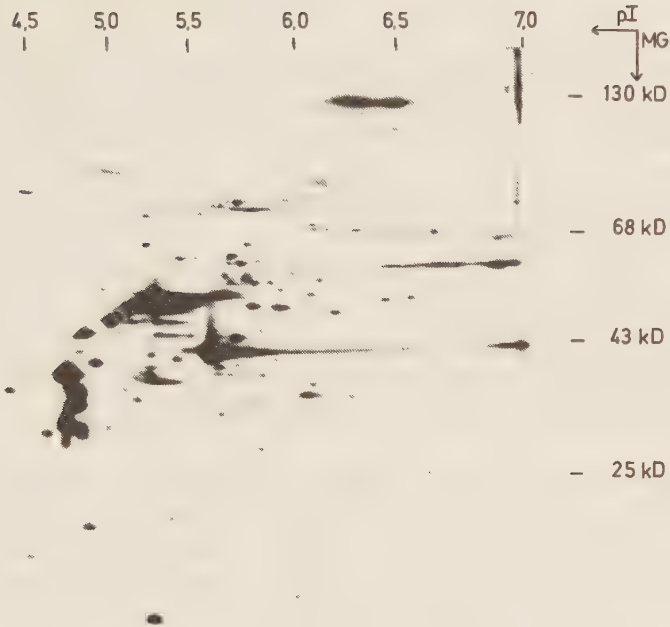


Abb. 6: Autoradiographische Darstellung des 2D-Proteinmusters von zytoskeletalen Proteinen einer humanen Fibroblasten-Zelllinie.

Abgesehen von den Hauptkomponenten enthielt die zytoskeletale Fraktion nur wenige Proteine mit Molekulargewichten unter 42 kD.

3.3.3. Reproduzierbarkeit der Proteinmuster

Tritonlösliche Proteine zeigten bei unterschiedlichen Elektrophorese-Läufen desselben Präparates eine gute Reproduzierbarkeit der 2D-Proteinmuster. Anzahl, Position und relative Intensität waren im allgemeinen identisch.

Horizontale Spot-Verschiebungen im pH-Bereich über 6,4 durch kathodischen Drift sowie in dem Bereich des pH-Gradienten von 5,3 bis 5,6 für Proteine mit Molekulargewichten unter 42 kD wurden beobachtet.

Für die Spotreihen mit Molekulargewichten über 68 kD war eine unterschiedlich starke Konzentration und Auflösung möglich.

Die Präparationen tritonlöslicher Proteine aus unabhängig voneinander markierten Kulturen derselben Zelllinie ergaben gut übereinstimmende Proteinmuster mit identischen Positionen der Spots.

Die Konzentration der einzelnen Proteine war vergleichbar, abgesehen von Identitätsunterschieden, die die Spot-Reihen im hochmolekularen Bereich zeigten.

In wenigen Fällen traten zusätzliche Spots von geringer Intensität auf. Solche zusätzlichen Proteinflecken korrelierten häufig mit einer Abnahme der Konzentration von benachbarten Proteinen, die geringfügig unterschiedlich bezüglich ihres pI-Wertes oder Molekulargewichtes waren.

Mehrere Variationen wurden in einer Region des pH-Gradienten von 4,5 bis 5,3 festgestellt. Der langgestreckte, vertikal verdoppelte Proteinfleck bei 5,3 - 5,5/52 kD beispielsweise konnte schwächer ausgeprägt sein oder fehlen. Die beiden Spots mit dem pI-Wert 4,9 und den Molekulargewichten 32,5 kD und 34 kD wiesen Konzentrationsunterschiede auf, die in der Regel beide Proteine gleichzeitig betrafen.

Die einzelnen Präparationen zytoskeletaler Proteine zeigten regelmäßig das für diese Zellfraktion charakteristische 2D-Proteinmuster mit 13 bis 15 überdurchschnittlich stark vertretenen und wenigen Spots mittlerer und geringer Intensität.

Verhältnismäßig häufige Variationen im Proteinmuster betrafen die Präsenz von schwachen Spots im Molekulargewichtsbereich unter 42 kD und die Position und Konzentration von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 50 kD und 42 kD in der Region 5,6 bis 6,0 des pH-Gradienten.

Unter den beschriebenen Hauptkomponenten wurden für den Bereich der pI-Werte 5,2 bis 5,6 und der Molekulargewichte 53 kD bis 50 kD erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Proteinkonzentration und des Auflösungsvermögens festgestellt. In Zusammenhang mit hoher Proteinkonzentration in diesem Bereich traten mit gleichen pI-Werten langgestreckte Proteinflecken mit Molekulargewichten von 48 kD, 46 kD und 45 kD auf.

3-4. VERGLEICH VON UNFRAKTIONIERTEM ZELLMATERIAL UND ZELLFRAKTIONEN

Die vergleichende Betrachtung der 2D-Proteinmuster von unfraktioniertem Zellmaterial (Abb. 1), tritonlöslichen Proteinen (Abb. 5) und zytoskeletaler Zellfraktion (Abb. 6) zeigte drei deutlich unterschiedliche, für die jeweilige Präparation charakteristische Muster.

Gegenüber dem unfraktionierten Zellmaterial mit zahlreichen schwachen Spots und einigen überdurchschnittlich hoch konzentrierten Proteinen ergaben die tritonlöslichen Proteine ein ausgewogenes Muster hinsichtlich der Position und Konzentration der Polypeptide.

Die zytoskeletale Zellfraktion setzte sich aus einer geringeren Anzahl von Proteinen zusammen. Die ca. 15 Hauptkomponenten waren durch ihre auffallend hohe Konzentration und typische Position im Muster des unfraktionierten Zellmaterials identifizierbar; in der tritonlöslichen Zellfraktion wurden einige dieser Proteine als schwache Spots abgebildet.

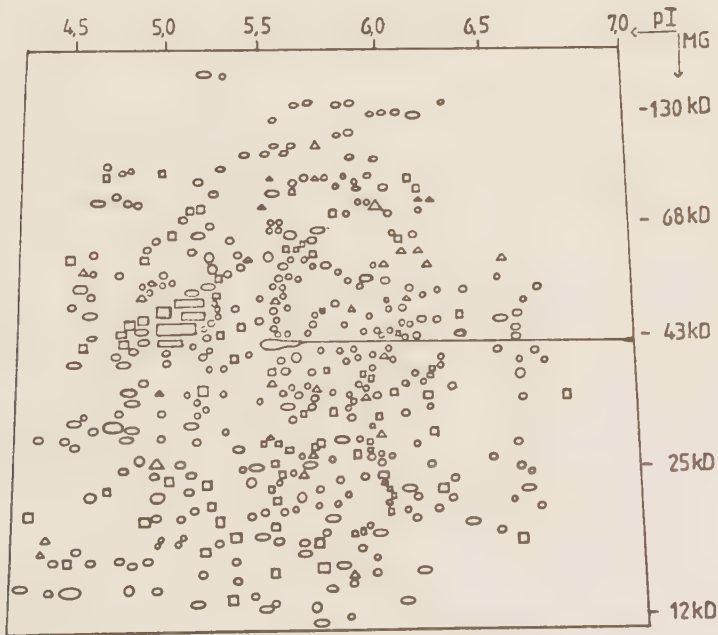


Abb. 7: Schematische Wiedergabe der Proteinmuster von unfraktioniertem Zellmaterial und tritonlöslichen Proteinen.

Darstellung der Protein-Spots: ○ beiden Präparationen gemeinsam, □ zusätzlich in unfraktioniertem Zellmaterial, △ zusätzlich in der tritonlöslichen Zellfraktion.

Abb. 7 zeigt die schematische Darstellung der 2D-Proteinmuster von unfraktioniertem und tritonlöslichem Zellmaterial, gewonnen aus zwei Kulturansätzen derselben Zelllinie; zusätzlich zu gemeinsamen Proteinen sind die nur für jeweils eine der beiden Präparationen spezifischen Spots eingezeichnet. Es wurden 440 Proteinflecken ausgewertet, die ebenso für die Präparationen zahlreicher weiterer Zelllinien charakteristisch waren.

74,1% dieser Proteine waren bei unfraktioniertem Zellmaterial und der tritonlöslichen Fraktion identisch. Spezifisch nur im Muster des gesamten Zellproteins enthalten waren weitere 19%. 6,9% zusätzliche Spots entstanden bei der Präparation der tritonlöslichen Proteine.

Dementsprechend wurden im 2D-Proteinmuster des unfraktionierten Zellmaterials 93,1% und in dem der tritonlöslichen Proteine 81% der durch beide Präparationen erhaltenen Anzahl von Spots dargestellt.

3.5. 2D-MUSTER VON FIBROBLASTEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM GONOSOMENTYP

3.5.1. Charakterisierung der Zelllinien und zytogenetische Kontrolle

Zur vergleichenden Analyse wurden die 2D-Proteinmuster von unfractioniertem Zellmaterial und tritonlöslichen Proteinen aus 33 nicht klonierten Fibroblasten-Zelllinien herangezogen.

17 Zelllinien hatten den normalen Karyotyp 46,xx, oder 46,xy (Tab. 1). In zwei Fällen stammten zwei Zelllinien aus demselben Individuum: F150 und F149 wurden aus Biopsien vom Oberschenkel und dem Skrotum desselben Säuglings, F6 und F7 aus Biopsien vom Oberschenkel und der Lunge eines Föten gewonnen. Eine weitere aus fötaler Lunge gewonnene Fibroblasten-Zelllinie war F2. Die Mosaik-Zelllinie F87 stammte aus Gonadengewebe.

Einen gonosomal aberranten Karyotyp mit unterschiedlichen zusätzlichen oder fehlenden Geschlechtschromosomen wiesen 13 Zelllinien auf (Tab. 2). Die Fibroblasten stammten, ebenso wie die meisten gonosomal normalen Zelllinien aus Hautbiopsien, pränatal oder postnatal vom Oberarm oder Oberschenkel entnommen.

Jede der drei Mosaik-Zelllinien F85, F86, F87 setzte sich aus Zelllinien mit unterschiedlichem Gehalt an Gonosomen zusammen.

In Tabelle 1 und 2 sind neben den Charakteristika der Zelllinien die Anzahl der insgesamt vorangegangenen Zellkultur-Passagen (1:2), sowie der Tag der Zellernte nach der letzten Passage für die Präparationen angegeben, die autoradiographisch ausgewertet wurden.

Im Verlauf der Zellkultur wurde der Karyotyp der Zelllinien bei Passagennummern, die im Bereich der Zellernten lagen, in Stichproben überprüft.

Es wurden strukturell und in den meisten Fällen numerisch normale Chromosomensätze festgestellt; einzelne Fälle ergaben Verluste eines Autosoms in weniger als der Hälfte der untersuchten Mitosen einer Zelllinie. Abb. 8 zeigt als Beispiel die Karyogramme der Zelllinien F40 und F31 mit dem normalen Karyotyp 46,xx bzw. 46,xy.

Fibroblastenzelllinie	Karyotyp	Alter des Individuums	Präparation des unfraktionierten Zellmaterials		Präparation der tritonlöslichen Proteine	
			Passagenr./Erntetag	Einbau ^3H Leuzin [cpm]	Passagenr./Erntetag	Einbau ^3H Leuzin [cpm]
F 50	46, xx	neugeboren	15/4	$1,2 \times 10^7$	14/5	$1,6 \times 10^7$
F 34	46, xx	3 Jahre	8/4	$1,0 \times 10^7$	12/4	$2,7 \times 10^7$
F 88	46, xx	4 Jahre	9/3	$1,3 \times 10^7$	10/4	$1,4 \times 10^7$
F 15	46, xx	7 Jahre	10/4	$1,2 \times 10^7$	9/5	$2,2 \times 10^7$
F 42	46, xx	11 Jahre	13/5	$1,6 \times 10^7$	10/5	$2,3 \times 10^7$
F 18	46, xx	12 Jahre	15/4	$1,5 \times 10^7$	15/4	$2,2 \times 10^7$
F 40	46, xx	26 Jahre	12/4	$4,1 \times 10^7$	13/3	$4,3 \times 10^7$
F 2	46, xy	Fötus	12/3	$3,4 \times 10^7$	14/3	$2,6 \times 10^7$
F 6	46, xy	Fötus	14/4	$3,5 \times 10^7$	15/3	$2,6 \times 10^7$
F 7	46, xy	Fötus	14/3	$3,4 \times 10^7$	14/3	$3,6 \times 10^7$
F 13	46, xy	Fötus	9/4	$1,7 \times 10^7$	8/4	$1,6 \times 10^7$
F 149	46, xy	10 Wochen	13/4	$1,5 \times 10^7$	13/4	$1,6 \times 10^7$
F 150	46, xy	10 Wochen	16/4	$2,5 \times 10^7$	12/4	$2,6 \times 10^7$
F 31	46, xy	4 Jahre	16/4	$1,5 \times 10^7$	16/4	$1,4 \times 10^7$
F 46	46, xy	20 Jahre	16/4	$1,8 \times 10^7$	15/4	$3,2 \times 10^7$
F 1	46, xy	erwachsen	13/4	$1,2 \times 10^7$	13/4	$1,8 \times 10^7$
F 43	46, xy	unbekannt	11/4	$4,0 \times 10^7$	10/3	$4,1 \times 10^7$

Tab. 1: Untersuchte humane Fibroblasten-Zelllinien mit normalem Karyotyp.

Fibroblastenzelllinie	Karyotyp	Alter des Individuums	Präparation des unfraktionierten Zellmaterials		Präparation der tritonlöslichen Proteine	
			Passagennr./Erntetag	Einbau ^3H Leuzin [cpm]	Passagennr./Erntetag	Einbau ^3H Leuzin [cpm]
F 3	45, xo	Fötus	11/4	$2,0 \times 10^7$	11/4	$2,5 \times 10^7$
F 14	45, xo	Fötus	13/4	$1,5 \times 10^7$	8/4	$2,7 \times 10^7$
F 48	45, xo	17 Jahre	15/4	$2,5 \times 10^7$	16/3	$2,3 \times 10^7$
F 37	45, xo	19 Jahre	15/4	$1,2 \times 10^7$	14/4	$2,3 \times 10^7$
F 44	45, xo	26 Jahre	16/4	$1,4 \times 10^7$	16/3	$1,3 \times 10^7$
F 36	45, xo	unbekannt	12/3	$3,1 \times 10^7$	13/3	$3,0 \times 10^7$
F 39	47, xxx	unbekannt	14/4	$9,3 \times 10^7$	15/4	$4,0 \times 10^7$
F 45	48, xxxx	unbekannt	15/4	$2,0 \times 10^7$	15/4	$1,3 \times 10^7$
F 10	47, xxy	Fötus	13/4	$1,6 \times 10^7$	12/3	$2,7 \times 10^7$
F 11	47, xxy	Fötus	9/4	$1,1 \times 10^7$	---	---
F 52	47, xxy	20 Jahre	15/5	$1,3 \times 10^7$	16/3	$2,3 \times 10^7$
F 41	49, xxxxy	5 Jahre	15/4	$3,5 \times 10^7$	16/5	$1,4 \times 10^7$
F 51	47, xyy	neugeboren	11/4	$2,8 \times 10^7$	11/4	$2,5 \times 10^7$
F 85	45, xo/ 46, xy	19 Jahre	15/3	$1,6 \times 10^7$	15/3	$1,0 \times 10^7$
F 86	45, xo/ 46, xy	1 Jahr	10/3	$1,2 \times 10^7$	10/3	$1,4 \times 10^7$
F 87	46, xx/ 47, xxy/ 48, xxyy	10 Jahre	2/3	$3,2 \times 10^7$	5/3	$2,3 \times 10^7$

Tab. 2: Untersuchte humane Fibroblasten-Zelllinien mit gonosomal aberrantem Karyotyp.

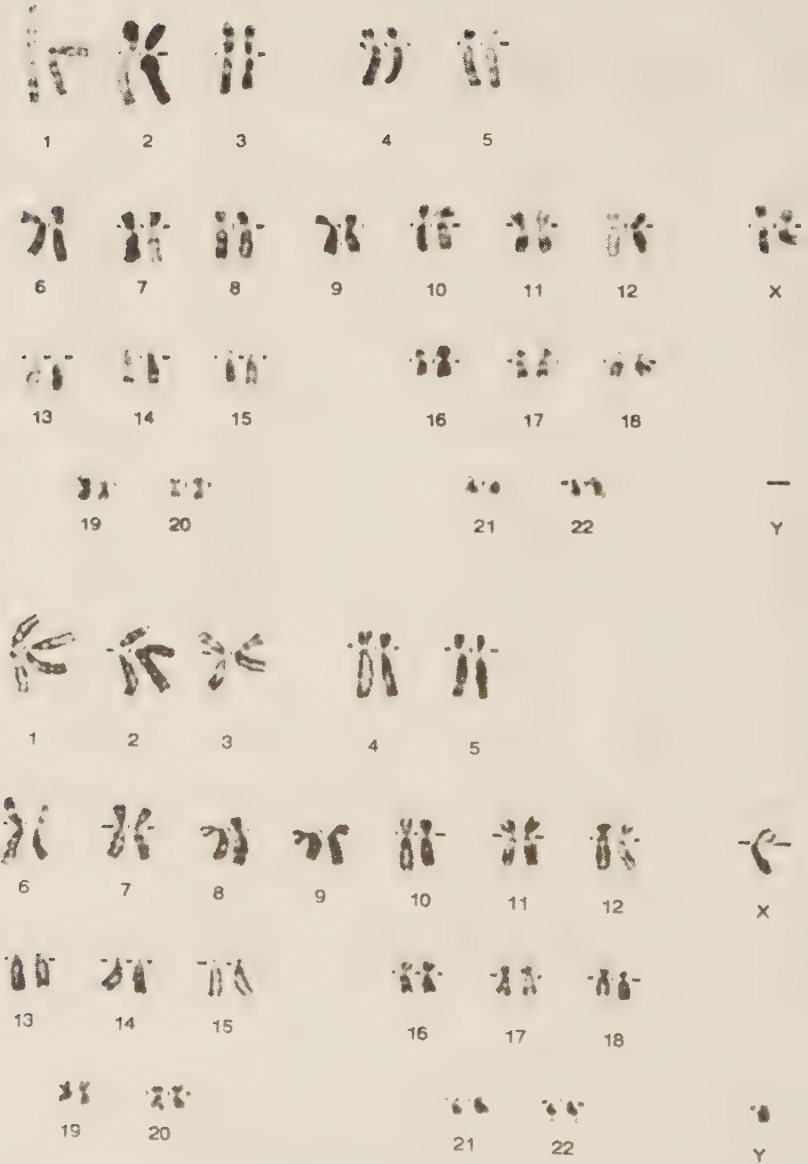


Abb. 8: Karyogramme der Zelllinien F40 (oben) und F31 (unten) mit normalem weiblichen (46,xx) bzw. männlichen (46,xy) Karyotyp.

3.5.2. Autoradiographische 2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials

Die 2D-Muster des unfractionierten radioaktiv markierten Zellmaterials von Zelllinien mit normalem männlichen und weiblichen Karyotyp wurden paarweise wie unter 2.6.3. beschrieben verglichen.

Abbildung 9 zeigt gefundene Unterschiede am Beispiel der Zelllinien F₃₁ (46,xy) und F₅₀ (46,xx). Diese beiden Präparationen wiesen unter 410 Spots je Muster insgesamt 34 quantitative und qualitative Varianten auf; zusätzliche oder erheblich stärker auftretende Spots sind im jeweiligen Muster mit Pfeilen gekennzeichnet. Polypeptide, die der zytoskeletalen Fraktion zugeordnet worden waren, wurden nicht berücksichtigt.

Die Überprüfung dieser Unterschiede bei allen anderen Zelllinien, sowie verschiedenen Präparationen gleicher Zelllinien ergab für fünf dieser Proteine eine Zelllinien-Spezifität: Das Polypeptid p₃ (5,9/63 kD) war wie bei F₃₁ oder deutlich schwächer konzentriert abgebildet. p₄ (6,05/29 kD) und p₅ (6,05/28 kD) zeigten korrelierte Varianz; entweder waren beide, wie bei F₃₁, oder p₄, wie bei F₅₀, oder p₅ alleine und stärker konzentriert vorhanden. Der Spot p₆ (5,3/22 kD) fehlte oder war meist schwächer konzentriert als bei F₃₁ vorhanden. p₆ trat in vielen Fällen gekoppelt mit einem benachbarten etwas basischeren und größeren Polypeptid auf, das keine Zelllinien-Spezifität zeigte.

Zusätzlich wurden in weiteren Muster-Vergleichen spezifische Varianten der Spots p_{1a}, p_{1b} und p₂ gefunden: Mit einem pI-Wert bei 5,8 konnten p_{1a} (45 kD) stärker konzentriert ohne den etwas basischeren Spot p_{1b} (45 kD) oder mit ganz schwachem p_{1b} auftreten, ebenso p_{1b} ohne oder mit ganz schwachem p_{1a}. Als dritte Variante waren p_{1a} und p_{1b} etwa gleichstark konzentriert wie bei F₃₁ und F₅₀. Das Protein p₂ (5,6/27 kD) trat zusätzlich auf oder fehlte wie bei F₅₀ und F₃₁.

In Tabelle 3 sind die sieben Spots für die 2D-Muster aller Zelllinien aufgelistet: + kennzeichnet die zusätzliche beziehungsweise stärker konzentrierte Variante eines Spots.

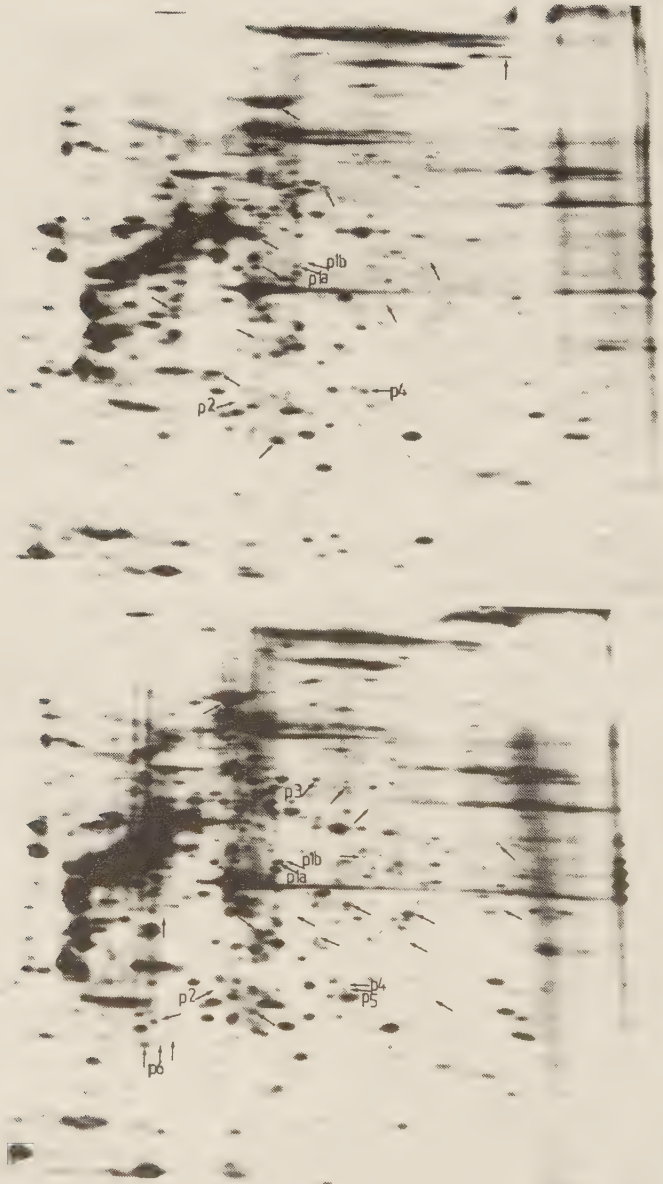


Abb. 9: Vergleichende Analyse des unfractionierten metabolisch markierten Zellmaterials einer XX-Zelllinie (oben, F50) und einer XY-Zelllinie (unten, F31). Pfeile zeigen zusätzliche oder stärker konzentrierte Proteine in jedem der beiden Muster.

Zelllinie	Karyotyp	pra	p1b	p2	p3	p4	p5	p6
F 50	46, xx	+	+	-	-	+	-	-
F 34	46, xx	-	+	-	-	-	+	-
F 88	46, xx	+	+	-	+	+	+	+
F 15	46, xx	-	+	-	-	+	-	-
F 42	46, xx	+	-	-	-	-	+	-
F 18	46, xx	+	-	+	+	-	+	+
F 40	46, xx	+	-	-	-	-	+	-
F 2	46, xy	-	+	-	-	-	-	+
F 6	46, xy	+	-	-	+	-	+	+
F 7	46, xy	+	-	-	+	-	-	+
F 13	46, xy	+	+	+	+	+	-	+
F 149	46, xy	+	+	-	-	+	-	-
F 150	46, xy	+	+	-	-	+	-	-
F 31	46, xy	+	+	-	+	+	+	+
F 46	46, xy	+	+	+	+	+	+	+
F 1	46, xy	+	+	-	+	+	+	+
F 43	46, xy	-	+	-	-	-	+	+
F 3	45, xo	+	+	-	-	+	-	-
F 14	45, xo	+	+	-	+	+	-	+
F 48	45, xo	-	+	-	-	-	+	-
F 37	45, xo	+	-	+	-	+	+	-
F 44	45, xo	+	+	-	-	-	+	-
F 36	45, xo	-	+	-	+	-	+	+
F 39	47, xxx	+	+	-	+	+	-	-
F 45	48, xxxxx	+	-	-	-	-	-	+
F 10	47, xxy	-	+	+	-	+	-	-
F 11	47, xxy	+	-	-	+	+	-	-
F 52	47, xxy	-	+	-	+	-	+	+
F 41	49, xxxxy	+	+	-	-	-	+	+
F 51	47, xyy	+	-	-	-	-	-	-
F 85	46, xy/ 45, xo	+	+	-	-	-	+	+
F 86	46, xy/ 45, xo	+	-	-	+	-	+	+
F 87	46, xx/ 47, xxy/ 48, xxyy	+	-	-	-	+	+	+

Tab.3: Variante Proteine im autoradiographischen 2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials der Fibroblasten- Zelllinien. + kennzeichnet zusätzliche oder stärker konzentrierte Varianten, - fehlende bzw. schwächer konzentrierte Varianten.

3.5.2.1. Individuelle Unterschiede

Die Varianten der Proteine p1a, p1b, p2, p3 und p6 könnten nach dieser Analyse als spezifisch für die individuelle Herkunft der jeweiligen Fibroblasten angesehen werden und möglicherweise unter genetischer Kontrolle stehen. Der Spot p1a wurde alleine bei sieben Zelllinien, zusammen mit einem schwachen Spot p1b bei zwei Zelllinien festgestellt. p1b trat alleine bei drei Zelllinien, zusammen mit einem schwachen p1a bei acht Zelllinien von sieben Individuen auf. Gleichkonzentriertes p1a und p1b ergab sich für 14 Zelllinien von 13 Individuen.

Das Polypeptid p2 wurde für verschiedene Präparationen der fünf Zelllinien F18, F13, F46, F37 und F10 mit unterschiedlicher Stärke des Spots beobachtet.

Der Spot p3 trat stärker konzentriert bei 14 Zelllinien auf; unter ihnen waren die Zelllinien F6 und F7 desselben Föten.

Im 2D-Muster von 18 Zelllinien aus 17 Individuen war der Spot p6 enthalten.

Das korrelierte Auftreten von p4 und p5 war Zelllinien-spezifisch. Da die Varianten dieser Proteine jedoch für die Zelllinien von Haut (F6) und Lunge (F7) desselben Föten unterschiedlich waren, kommt eine individuelle Varianz nur in Frage, wenn die Ausprägung dieser Proteine organspezifisch ist.

3.5.2.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Im 2D-Proteinmuster wurden grundsätzlich keine Spots festgestellt, die nur bei allen Zelllinien mit Karyotyp 46,xy auftraten oder spezifisch für alle Zelllinien mit Karyotyp 46,xx waren.

Auffallend war das Fehlen von p6 bei fünf der sieben XX-Zelllinien. Dieser Spot wurde bei acht der zehn XY-Zelllinien aus acht Individuen unterschiedlichen Alters beobachtet. Das Auftreten von p6 stimmte für Haut und Lunge (F7) überein und fehlte bei Haut- und Skrotumfibroblasten (F150, F149) desselben Säuglings. Die Verteilung dieses Spots bei allen gonosomal aberranten Fibroblasten spricht gegen eine Geschlechtsspezifität: einerseits fehlte p6 bei der XYY-Zelllinie F51 und bei einer der XXY-Zelllinien, andererseits wurde er für zwei XO-Zelllinien und eine der beiden poly-X-Zelllinien nachgewiesen. Problematisch für die Bestimmung dieses Spots ist seine meist sehr schwache Abbildung, sowie die Lage in einem pl-Bereich, der durch methodisch bedingte Variationen auffiel (siehe 3.2.2.).

Die metabolische Markierung ergab für unfraktioniertes Zellmaterial von Hautfibroblasten mit normalem männlichen bzw. weiblichem Karyotyp eine geringfügig unterschiedliche Einbaurate an ^3H -Leuzin von $2,2 \times 10^7$ cpm und $1,7 \times 10^7$ cpm.

3.5.2.3. Gewebsspezifische Unterschiede

Lungenfibroblasten wurden auf Grund ihres spezifischen Wachstumsverhalten (siehe 3.1.1.) einen Tag früher als die meisten Hautfibroblasten geerntet; der Einbau von radioaktivem ^3H -Leuzin lag geringfügig über dem durchschnittlich für Hautfibroblasten ermittelten.

Die 2D-Proteinmuster der beiden Zelllinien F7 und F2 aus der Lunge männlicher Föten zeigte gegenüber denen der Hautfibroblasten keine zusätzlichen Proteine.

Quantitative Veränderungen einzelner Spots waren besonders auffällig bei den zytoskeletalen Proteinen. Die spezifisch geringere Konzentration von Proteinen im pI-Bereich von 5,1 bis 5,4 mit Molekulargewichten zwischen 51 kD und 45 kD und der beiden Proteine mit dem pI-Wert 4,85 und 36 kD bzw. 34 kD könnte in Zusammenhang mit dem organspezifischen Zellwachstum stehen.

Die gleiche Erklärung wäre für das Fehlen der Proteine p4 und p5 (siehe Abb. 9), sowie eines benachbarten Spots mit einem pI-Wert von 5,95 und einem Molekulargewicht von 27 kD bei beiden Lungen-Zelllinien denkbar.

Der Vergleich der 2D-Muster der Fibroblasten von Skrotum und Oberschenkel desselben Säuglings (F149, F150) ergab wenige Spot-Varianten, die auch im Muster anderer Hautfibroblasten auftraten. Die Zelllinie von Skrotum zeigte keine zusätzlichen Proteine, die bei allen Hautfibroblasten fehlten.

3.5.2.4. Unterschiede bei gonosomal aberranten Zelllinien

Unter den untersuchten 13 gonosomal aberranten Zelllinien waren sechs mit dem Karyotyp 45,xo, eine mit 47,xxx, eine mit 48,xxxx, drei mit 47,xyy, eine mit 49,xxxxy und eine mit dem Karyotyp 47,xyy. Die 2D-Proteinmuster des unfractionierten Zellmaterials dieser Zelllinien zeichneten sich durch eine vergleichsweise hohe Anzahl an varianten Spots aus, die jedoch größtenteils auch in einzelnen der 2D-Muster von Fibroblasten mit normalem Karyotyp gefunden wurden.

Das Proteinmuster jeder der sechs XO-Zelllinien, deren Teilungsrate und metabolische Markierung der der Fibroblasten mit normalem Karyotyp entsprach, wurde mit dem einer XY-Zelllinie verglichen. Nach Abzug der Spot-Varianten, die sich in den XX-XY-Vergleichen als Zelllinien-unspezifisch erwiesen, wurden die übrigen Unterschiede in den Mustern aller anderen XO-Zelllinien und Y-enhaltenden Zelllinien überprüft.

Abbildung 10 zeigt als Beispiel den Vergleich von F37 (45,x0) mit F31 (46,xy) aus Abbildung 9. Jeder der bei F37 gegenüber F31 fehlenden Spots, deren Lage mit Pfeilen gekennzeichnet ist, war bei mehr als drei der anderen XO-Zelllinien vorhanden.

Auch alle anderen XO-XY-Vergleiche ergaben für das radioaktiv markierte totale Zellprotein weder spezifisch fehlende noch zusätzliche Proteine bei diesen sechs XO-Zelllinien.



Abb. 10: Unfraktioniertes metabolisch markiertes Zellmaterial einer XO-Zelllinie (F37). Pfeile zeigen auf Positionen von Spots, die gegenüber F31 (XY) fehlen.

In der Chromosomenanalyse wurden für die Zelllinie F51 in jeder der 50 untersuchten mitotischen Zellkerne zwei Y-Chromosomen ermittelt. Das unfraktionierte Zellmaterial ergab eine im üblichen Rahmen liegende Einbaurate an ^3H -Leuzin von $2,8 \times 10^7$ cpm. Das Proteinmuster (Abb. 11) zeigte gegenüber vielen anderen Zelllinien einige Spot-Varianten, die auf den Abbau höher konzentrierter Proteine zurückzuführen waren. Die starke Auflösung der vier Spot-Reihen mit Molekulargewichten bei 80 kD, 85 kD, 90 kD und 100 kD war spezifisch für diesen Elektrophorese-Lauf und wurde unabhängig vom Karyotyp auch für andere Zelllinien beobachtet.

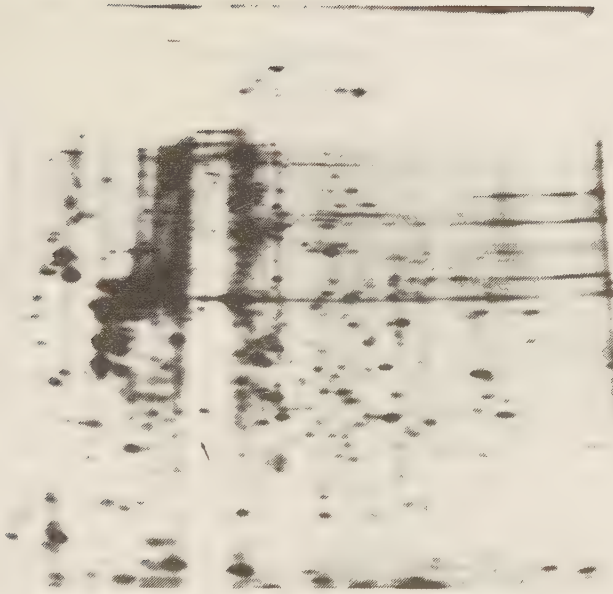


Abb. 11: Unfraktioniertes metabolisch markiertes Zellmaterial der XYY-Zelllinie (F51). Erläuterung des Pfeils unter 3.5.2.4.

Der Spot mit dem Molekulargewicht von 22 kD und dem pI-Wert von ca. 5,4 (Pfeil in Abb. 11) wurde bei größerer, vom Elektrophorese-Lauf abhängiger Breite der pH-Region von 5,3 bis 5,5 weiter rechts in diesem Bereich abgebildet. Es war in den 2D-Mustern aller Zelllinien, die das Y-Chromosom enthielten, vorhanden, wurde jedoch auch unter den XX-Zelllinien bei F18, F50 und F88, sowie bei der XXX-Zelllinie F39 und unter den XO-Zelllinien bei F48, F14 und F36 festgestellt.

Es ergab sich für die XYY-Zelllinie F51 kein Protein, das gegenüber allen Zelllinien ohne Y-Chromosom zusätzlich und gegenüber allen Zelllinien mit einem Y-Chromosom stärker konzentriert vorhanden war.

Die Zelllinie F45 mit dem Karyotyp 48,xxxx zeigte in Proteinmuster des unfraktionierten Zellmaterials zwei Proteine, die gegenüber Zelllinien mit einem oder zwei X-Chromosomen höher konzentriert waren (Abb. 12).



Abb. 12: Unfraktioniertes metabolisch markiertes Zellmaterial der XXXX-Zelllinie (F45). Erläuterung der Pfeile unter 3.5.2.4.

Das Protein p7 (5,25/20 kD) wurde bei zwei verschiedenen Präparationen von F45, bei F39 (47,xxx) und bei F41 (47,xxxxy) stärker abgebildet als bei allen übrigen Zelllinien. Die Ausprägung dieses Spots war grundsätzlich zu schwach, um Konzentrationsunterschiede zwischen Zelllinien mit einem und zwei X-Chromosomen festzustellen.

Das Protein p8 (6,2/37 kD) trat bei beiden Präparationen von F45 und bei F39 (47,xxx) etwa gleich konzentriert auf. In den Proteinmustern der XX-Zelllinien F50, F34, F88 und F50, der XY-Zelllinien F31 und F46, der Zelllinien F44 (XO), F51 (XYY) und F10 (XXY) war es schwächer abgebildet. Für alle anderen Zelllinien konnte dieses Protein nicht nachgewiesen werden.

Der Spot von Aktin war in Relation zu den übrigen zytoskeletalen Komponenten größer als bei allen Zelllinien mit einem X-Chromosomen.

Das totale Zellprotein der drei Zelllinien mit dem Karyotyp 47,xy wies mit durchschnittlich $1,3 \times 10^7$ cpm eine verhältnismäßig geringe Einbaurate an ^3H -Leuzin auf, das

der Zelllinie F41 mit dem Karyotyp 49,xxxxy mit $3,5 \times 10^7$ eine starke metabolische Markierung.

Mit Ausnahme von p7 und p8 zeigten die 2D-Proteinmuster aller vier Zelllinien im Vergleich mit Zelllinien ohne Y-Chromosomen sowie XY-Fibroblasten ausschließlich Unterschiede, die auf Zellkultur- oder vom Gonosomen-Gehalt unabhängige, möglicherweise individuelle Varianz zurückzuführen waren.

3.5.3. 2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials nach Silberfärbung

Die Proteinmuster des unfractionierten Zellmaterials aus nicht markierten Fibroblasten wurden nach Silberfärbung auf alle Spot-Varianten geprüft, die in den autoradiographischen Mustern festgestellt worden waren.

Die Proteine p1a und p1b wurden als Spots mit unterschiedlichen Farbtönen abgebildet. Das Auftreten dieser beiden Polypeptide in den Mustern der einzelnen Zelllinien entsprach der in Tab. 3 aufgelisteten Verteilung in den Autoradiographien.

Auch das Protein p2 wurde wie nach metabolischer Markierung nur bei den Zelllinien F18, F13, F46, F37 und F10 festgestellt. Der Spot war gegen den benachbarten, etwas basischeren und größeren Spot, der bei Silberfärbung stärker abgebildet wurde, nicht abgegrenzt.

p3 war nach Silberfärbung nur in wenigen Fällen zu sehen und so schwach konzentriert, daß quantitative Varianten nicht festgestellt werden konnten.

Im pI- und Molekulargewichts-Bereich von 6,05/28-29 kD der Proteine p4 und p5 und im Bereich 6,2/37 kD von p8 wurden keine deutlichen Spots angefärbt.

Die Region des pH-Gradienten von 5,3 bis 5,5 zeigte im Bereich der Molekulargewichte unter 24 kD wenige, ganz schwach gefärbte diffuse Spots, die eine Prüfung des Proteins p6 sowie des bei F51 beschriebenen Spots (5,4/22 kD) nicht zuließen.

Das Protein p7 wurde auch durch Silberfärbung dargestellt; eine Differenzierung von Konzentrationsunterschieden war nicht immer möglich.

Daneben wurden die 2D-Muster aller Zelllinien auf zusätzliche Spots untersucht, die im unfractionierten Zellmaterial einzelner Zelllinien mit vorhandenem Y-Chromosom gegenüber solchen ohne Y-Chromosom auffielen.

Abbildung 13 zeigt solche Unterschiede am Beispiel einer XY-Zelllinie (F13) gegenüber einer XO-Zelllinie (F48).

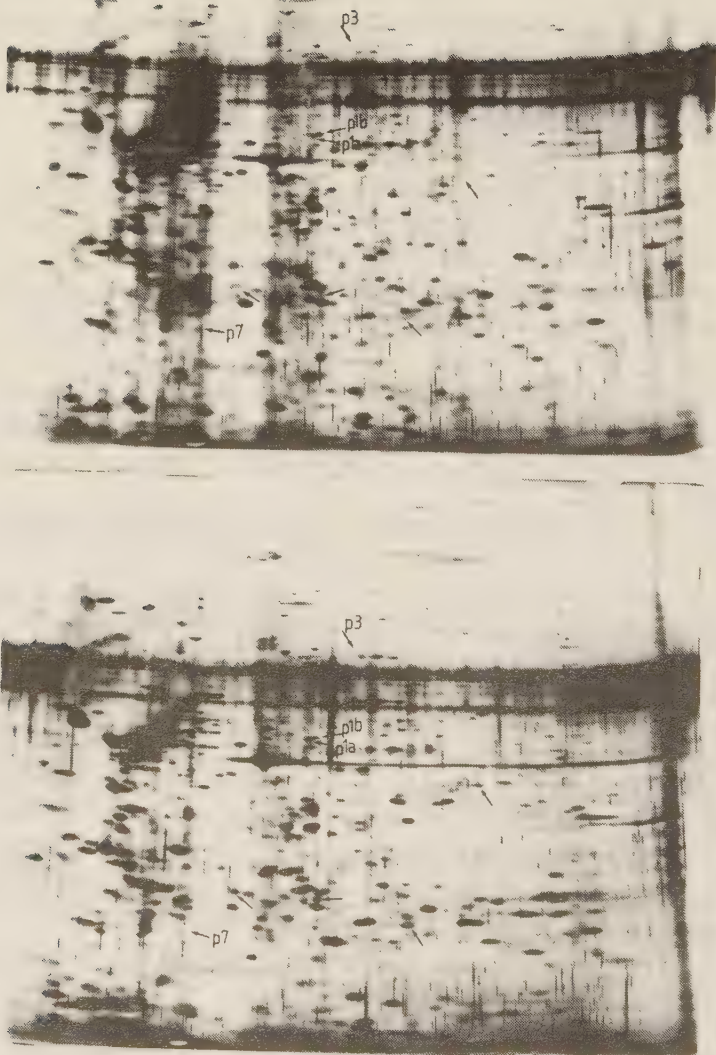


Abb. 13: Vergleichende Analyse des unmarkierten unfraktionierten Zellmaterials einer XO-Zelllinie (oben, F48) und einer XY-Zelllinie (unten, F13) nach Silberfärbung. Pfeile zeigen zusätzliche oder stärker konzentrierte Proteine im Muster von F13, sowie deren Positionen im Muster von F48.

Wie bei allen anderen derartigen Vergleichen konnte auch nach Silberfärbung der Muster von nicht markiertem unfraktioniertem Zellmaterial für keinen der Spots das kontinuierliche Fehlen in allen Zelllinien ohne Y-Chromosom oder das zuverlässige Auftreten in allen Zelllinien mit Y-Chromosom festgestellt werden.

Die Summe der durch Zellkultur, 2D-Gelelektrophorese und die Methode der Silberfärbung bedingten Unterschiede im Proteinmuster ließ die zuverlässige Analyse weiterer individueller Unterschiede mit Berücksichtigung von mehr als ca. 100 Proteinen nicht zu.

3.5.4. Autoradiographische 2D-Muster der tritonlöslichen Proteine

Die Proteinmuster der metabolisch markierten tritonlöslichen Proteine von Zelllinien mit normalem männlichen und weiblichem Karyotyp wurden paarweise verglichen; gefundene Unterschiede wurden in den Mustern verschiedener Präparationen gleicher Zelllinien und in denen der übrigen Zelllinien überprüft.

In Abbildung 14 sind zusätzliche oder deutlich stärker abgebildete Spots in den gegenübergestellten Mustern von F13 (46,xy) und F50 (46,xx) mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Vergleich von 305 Spots ergab 21 Unterschiede, unter denen sich zwei als Zelllinien-spezifisch erwiesen: Der Spot p2 (5,6/27 kD) war unterschiedlich konzentriert vorhanden oder fehlte völlig. Er war nach pI-Wert, Molekulargewicht und Lage zu den benachbarten Spots identisch mit dem unter 3.5.2. für unfraktioniertes Zellmaterial beschriebenen des Proteins p2. Der Spot p9 (6,2/39 kD) konnte fehlen wie bei F13, schwach wie bei F50 oder stärker abgebildet sein.

In weiteren Vergleichspaaren wurden zusätzlich Zelllinien-spezifisch Konzentrationsunterschiede sowie das Fehlen des Proteins p10 (6,1/39 kD) festgestellt.

Die Varianz der beschriebenen Spots ist in Tabelle 4 für alle Zelllinien aufgelistet.

3.5.4.1. Individuelle Unterschiede

Die Synthese des Proteins p2 war zurückzuführen auf die individuelle Herkunft der Zelllinien: wie bei unfraktioniertem Zellmaterial trat dieser Spot nur bei den Zelllinien F18, F13, F46, F37 und F10 auf. Konzentrationsunterschiede entstanden offenbar nicht Zelllinien-spezifisch.

Auch die Präsenz des Proteins p9 bei 24 Zelllinien aus 22 Individuen sowie des Proteins p10 bei 21 Zelllinien aus 20 Individuen war spezifisch für die Herkunft der Zelllinien. Die quantitative Varianz, die sich für beide Proteine als zelllinien-typisch erwies, könn-

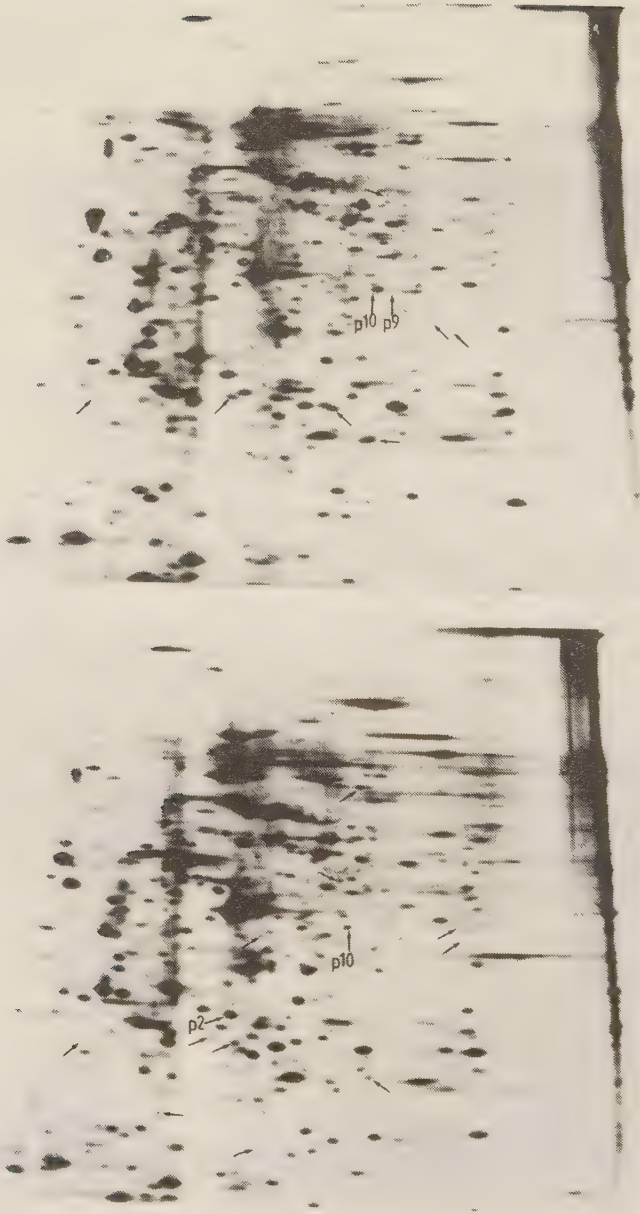


Abb. 14: Vergleichende Analyse der metabolisch markierten tritonlöslichen Proteine einer XX-Zelllinie (oben, F50) und einer XY-Zelllinie (unten, F13). Pfeile zeigen zusätzliche oder stärker konzentrierte Proteine in jedem der beiden Muster.

Zelllinie	Karyotyp	p2	p9	p10	Zelllinie	Karyotyp	p2	p9	p10
F 50	46, xx	-	+	++	F 3	45, xo	-	++	++
F 34	46, xx	-	-	++	F 14	45, xo	-	+	-
F 88	46, xx	-	++	++	F 48	45, xo	-	++	-
F 15	46, xx	-	++	+	F 37	45, xo	+	+	+
F 42	46, xx	-	++	-	F 44	45, xo	-	-	++
F 18	46, xx	+	-	++	F 36	45, xo	-	++	-
F 40	46, xx	-	++	++	F 39	47, xxx	-	++	+
F 2	46, xy	-	-	++	F 45	48, xxxx	-	++	++
F 6	46, xy	-	++	+	F 10	47, xxy	+	++	-
F 7	46, xy	-	+	+	F 11	47, xxy	nicht untersucht		
F 13	46, xy	++	-	++	F 52	47, xxy	-	++	-
F 149	46, xy	-	+	-	F 41	49, xxxxy	-	++	++
F 150	46, xy	-	++	-	F 51	47, xyy	-	++	-
F 31	46, xy	-	-	++	F 85	46, xy/ 45, xo	-	++	++
F 46	46, xy	++	-	++	F 86	46, xy/ 45, xo	-	++	-
F 1	46, xy	-	-	++	F 87	46, xx/ 47, xxy/ 48, xxyy	-	+	-
F 43	46, xy	-	+	+					

Tab. 4: Variante Proteine im autoradiographischen 2D-Muster von tritonlöslichen Proteinen der Fibroblasten-Zelllinien. - kennzeichnet fehlende, + vorhandene, ++ stark konzentrierte Varianten.

te bei p10 unter genetischer Kontrolle stehen. Im Muster des unfractionierten Zellmaterials fehlte p9; im Bereich von p10 wurde in einigen Fällen ein schwacher Spot abgebildet, der keine Differenzierung der Konzentration zuließ.

Die 2D-Muster der tritonlöslichen Proteine zeigten in den Regionen der unter 3.5.2.1. beschriebenen Polypeptide p3, p4, p5 und p6 keine vergleichbaren Spots. Das Protein p1a war schwächer, der Spot von p1b nicht abgebildet.

3.5.4.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Die Verteilung der Zelllinien-spezifischen Varianten der drei Proteine war unabhängig vom Gonosomen-Gehalt der Zellen.

Der Mittelwert des nach metabolischer Markierung für die Fraktion der tritonlöslichen Proteine gemessenen ^3H -Leuzin betrug bei XX- wie bei XY-Zelllinien im Durchschnitt $2,4 \times 10^7$ cpm.

Die Proteinmuster ergaben keine qualitativen Varianten, die mit dem Auftreten oder Fehlen des Y-Chromosoms im Karyotyp der Zelllinien korreliert waren.

3.5.4.3. Gewebsspezifische Unterschiede

Wie das unfractionierte Zellmaterial wies auch die Präparation der tritonlöslichen Proteine aus den beiden Zelllinien der Lunge (F2, F7) keine gegenüber Hautfibroblasten zusätzlichen Spots im 2D-Muster auf.

Abbildung 15 zeigt Konzentrationsunterschiede einzelner tritonlöslicher Proteine aus Haut- und Lungenfibroblasten (F6 und F7) desselben Föten. Die vergleichsweise schwache Abbildung der beiden Spots mit einem pI-Wert von 4,85 und den Molekulargewichten 36 kD und 32 kD war typisch für Lungenfibroblasten. Entsprechend der erheblich stärkeren Darstellung des Proteins p9 bei F6 sind Konzentrationsunterschiede dieses Zelllinien-spezifischen Polypeptids nicht auf die individuelle Herkunft der Zelllinie zurückzuführen. Alle übrigen quantitativen Varianten spiegelten vermutlich Unterschiede im Zellwachstum wieder und waren nicht gewebsspezifisch.

Die Verteilung der Spots im Muster tritonlöslicher Proteine aus Fibroblasten von Haut und Skrotum (F150, F149) desselben Säuglings war identisch. Unter den wenigen Polypeptiden, die Konzentrationsunterschiede aufwiesen, befand sich p9, dessen Spot bei den Hautfibroblasten stärker dargestellt war.



Abb. 15: Vergleichende Analyse der metabolisch markierten tritonlöslichen Proteine einer Haut-Zelllinie (oben, F6) und einer Lungen-Zelllinie (unten, F7) desselben Föten. Pfeile zeigen stärker konzentrierte Proteine in jedem der beiden Muster.

3.5.4.4. Unterschiede bei gonosomal aberranten Zelllinien

Die tritonlöslichen Zellfraktionen der 12 untersuchten Zelllinien ergab im allgemeinen einen, den Fibroblasten mit normalem Karyotyp entsprechenden Einbau an radioaktivem ^3H -Leuzin. Die Anzahl der Spot-Varianten im Proteinmuster war bei Zelllinien mit normalem Karyotyp und solchen mit gonosomalen Aberrationen vergleichbar.

Die sechs Zelllinien mit dem Karyotyp 45,xo zeigten beim Vergleich der 2D-Muster untereinander quantitative und qualitative Unterschiede einiger Polypeptide. Gegenüber den tritonlöslichen Proteinen der Zelllinien mit dem Karyotyp 46,xy wurden keine Proteine festgestellt, die den Präparationen aller XO-Zelllinien fehlten.

Abbildung 16 zeigt die Gegenüberstellung der Zelllinien F45 und F41 mit den Karyotypen 48,xxxx und 49,xxxxy. Die vier im Muster von F41 zusätzlich abgebildeten Spots wurden auch bei Präparationen anderer normaler und gonosomal aberranter Zelllinien unabhängig von der Präsenz des Y-Chromosoms gefunden.

Das Protein p7 (5,25/20 kD), dessen Konzentration im unfraktionierten Zellmaterial von poly-X-Zelllinien auffallend hoch war, wurde im Muster tritonlöslicher Proteine grundsätzlich stärker abgebildet. Es war jedoch bei allen Zelllinien mit einem oder zwei X-Chromosomen schwächer konzentriert, als das im benachbarten Spot bei 5,0/21 kD abgebildete Polypeptid. Das Muster tritonlöslicher Proteine zeigte keine Spots im Bereich des Proteins p8 (6,2/37 kD).



Abb. 16: Gegenüberstellung der metabolisch markierten tritonlöslichen Proteine der XXXX-Zelllinie (oben, F₄₅) und der XXXXY-Zelllinie (unten, F₄₁). Pfeile zeigen zusätzliche Proteine in jedem der beiden Muster.

Das Proteinmuster der XYY-Zelllinie F₅₁ (Abbildung 17) ergab gegenüber der XX-Zelllinie F₅₀ (Abbildung 14), die ebenfalls aus einem Neugeborenen stammte nur wenige Konzentrationsunterschiede der Polypeptide. Ebenso wie gegenüber anderen Zelllinien ohne Y-Chromosom wurden keine spezifisch zusätzlichen oder in ihrer Position veränderte Spots festgestellt.

Der für unfraktioniertes Zellmaterial unter 3.5.2.4. beschriebene Spot bei 5,4/22 kD, in Abbildung 17 mit Pfeil gekennzeichnet, fand sich im Muster aller Präparationen tritonlöslicher Proteine unabhängig vom Gonosomen-Gehalt der Zelllinien.

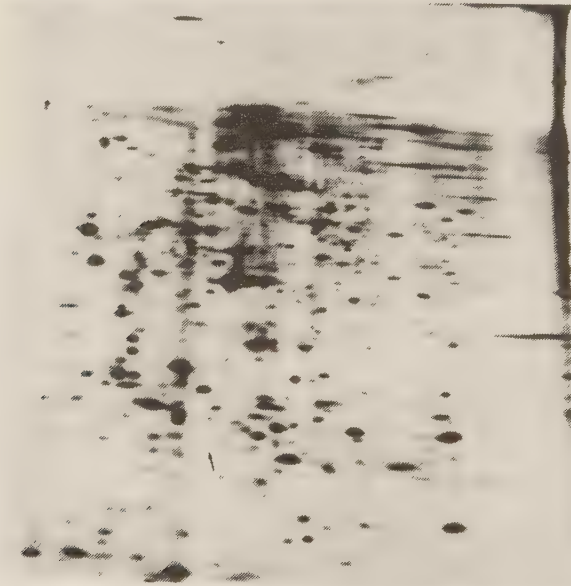


Abb. 17: Metabolisch markierte tritonlösliche Proteine der XYY-Zelllinie (F₅₁). Erläuterung des Pfeils im Text.

Im Muster der tritonlöslichen Proteine der beiden XXY-Zelllinien F₁₀ und F₅₂ wurde keine für ihre Gonosomen-Konstellation typischen quantitativen oder qualitativen Varianten festgestellt.

3.6. ANALYSE KLONIERTER FIBROBLASTEN-ZELLINIEN VON PATIENTEN MIT MOSAIK-KARYOTYPEN FÜR GONOSOMALE ABERRATIONEN

Klonierte Zelllinien waren aus den Mosaik-Zelllinien F87 (46,xx/47,xy/48,xxy), F85 (46,xy/45,xo) und F86 (46,xy/45,xo) gewonnen worden. Die Ausbeute der Klonierung nach dem unter 2.2. beschriebenen Verfahren lag in allen drei Fällen bei etwa 30%.

3.6.1. Zytogenetische Kontrolle

Aus jeder Klonierung wurden nur solche Klone untersucht, deren Zellwachstumsgeschwindigkeit im üblichen Rahmen lag und deren Karyotyp bei jeweils 50 mitotischen Zellen entweder kein Y-Chromosom oder in mindestens 90% der Mitosen ein Y-Chromosom aufwies.

Neben dem bei allen Klonen durchgeführten Fluoreszenz-Nachweis des Y-Chromosoms (siehe 2.3.1.) wurden in einigen Fällen vollständige Karyogramme (siehe 2.3.2.) angefertigt. Abbildung 18 zeigt als Beispiel die Karyogramme zweier Y-positiver Klone aus den Mosaik-Zelllinien F85 und F87.

Die Fibroblasten-Kultur F86 stammte aus der Biopsie vom Oberarm eines einjährigen Mädchens mit Turner-Syndrom. Unter 21 Klonen befanden sich 10 mit einem Y-Chromosom enthaltenden Karyotyp. Die übrigen wiesen kein Y-Chromosom auf, ihr Zellwachstum war jedoch sehr verzögert, so daß nur wenige Mitosen ausgewertet werden konnten.

Die 2D-Proteinmuster des unfractionierten Zellmaterials von vier der XY-Zelllinien aus F86, die alle am fünften Tag nach der vierten Zellpassage geerntet worden waren, wurden zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Muster klonierter Zelllinien herangezogen.



Abb. 18: Karyogramme von Y-positiven Zellklonen: F85/K16 (46,xy; oben), F87/K1 (47,xx; unten).

3.6.2. Reproduzierbarkeit der Proteinmuster

Die 2D-Muster des unfraktionierten Zellmaterials der tritonlöslichen Zellfraktion und der zytoskeletalen Proteine aller Klon-Zelllinien zeigte eine mit unklonierten Zelllinien vergleichbare Anzahl und Verteilung der Spots. Sie ergaben für einzelne Klone einer Mosaik-Zelllinie untereinander weniger Spot-Varianten als gegenüber den Mustern der verschiedenen unklonierten Zelllinien.

Im Muster des totalen Zellproteins fiel bei allen drei Klonierungen eine etwas stärkere Konzentration einzelner typischer Proteine im Vergleich zur ursprünglichen Mosaik-Zelllinie auf. Im Bereich der zytoskeletalen Proteine waren in diesen Mustern aller Klone vier bis fünf Spots in der pI-Region 5,1 bis 5,4 mit den Molekulargewichten 53 kD, 51 kD, 49 kD und 47 kD erheblich schwächer abgebildet. Ebenfalls in diesem Bereich erschienen die beiden Spots mit Molekulargewichten von 36 kD und 34 kD mit einem pI-Wert von 4,85 häufig horizontal verdoppelt; es handelte sich hierbei nicht um einen Artefakt der Präparation oder des Elektrophorese-Laufes. Unter unklonierten Zelllinien wurde dies bei wenigen Zelllinien offenbar in Abhängigkeit vom Zellwachstum und nicht zelllinien-spezifisch beobachtet.

Die tritonlöslichen Proteine zeigten gegenüber denen aus unklonierten Fibroblasten Varianten, die im Rahmen der Muster-Vergleiche unklonierter Zelllinien lagen. Wenige schwache Spots schienen spezifisch bei den Klonen etwas intensiver abgebildet. Gegenüber dem totalen Zellprotein waren einige der tritonlöslichen Proteine mit Molekulargewichten über 45 kD stärker konzentriert.

In den Mustern der unklonierten Mosaik-Zelllinien wurden keine Spots dargestellt, die bei den hieraus klonierten Zelllinien fehlten.

Für jede Klon-Zelllinie wurde je eine Präparation des unfraktionierten Zellmaterials, der tritonlöslichen und der zytoskeletalen Proteine sowohl aus metabolisch markierten als auch aus unmarkierten Zellen durchgeführt und entsprechend analysiert. In zwei Fällen wurden die Muster metabolisch markierter Klone vor der fluorographischen Auswertung mit Silber gefärbt. Hierbei wurden bei unfraktioniertem Zellmaterial fünf, bei der tritonlöslichen Fraktion sechs Spots zusätzlich abgebildet, die mit der autoradiographischen Darstellung nicht erfaßt wurden. Jeder dieser Spots wurde jedoch auch in den Mustern der nicht markierten Zellen festgestellt, die sich gemäß der Zellkultur-Vorbehandlung überwiegend in der G_0 -Phase des Zellzyklus befanden (siehe 3.1.2.). Sie waren somit durch Silberfärbung von nicht markiertem Zellmaterial in die vergleichende Analyse einbezogen.

Es ergaben sich keine Spot-Varianten, die in Korrelation mit einer unterschiedlichen Anzahl der Ernte vorausgegangener Zellpassagen standen. In Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Ernte nach der letzten Passage wurden in einigen Fällen quantitative Veränderungen der zytoskeletalen Proteine beobachtet.

3.6.3. Klone der Mosaik-Zelllinie F87 (46,xx/47,xy/48,xyy)

Die Fibroblasten-Zelllinie F87 stammte aus Gonadengewebe eines 10-jährigen Mädchens mit Ovotestes. Die Untersuchung von 110 mitotischen Zellen ergab ein Mosaik aus Zellen mit drei verschiedenen Karyotypen: 46,xx (86,5%), 47,xy (10,8%), 48,xyy (2,7%).

Durch Klonierung wurden 23 Zelllinien erhalten; zehn dieser Klone zeigten eindeutig einen Karyotyp mit 46,xx, sechs mit 47,xy und einer mit 48,xyy. Vier Zelllinien mit 46,xx (F87/K35, F87/K47, F87/K62, F87/K63) und drei mit 47,xy (F87/K1, F87/K10, F87/K46) entsprachen in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit den unklonierten Zelllinien und wurden zur vergleichenden Analyse herangezogen. Zellernte und Präparation erfolgten bei den Klonen mit 46,xx nach der 12. bis 16. Zellpassage am 4. bis 9. Tag, bei den Klonen mit 47, xy nach der 12. bis 14. Passage am 4. bis 7. Tag.

3.6.3.1. 2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials

Die Muster des totalen Zellproteins aus metabolisch markierten und unmarkierten Zellen mit dem Karyotyp 46,xx und 46,xy wurden paarweise verglichen (Abb. 19, Abb. 20), Spot-Varianten in den jeweils übrigen Zell-Klonen überprüft. Insgesamt wurden unter über 400 Spots im autoradiographischen Muster und unter ca. 350 Spots im Muster nicht markierter Klone jeweils ca. 30 überwiegend quantitative Varianten festgestellt, die meist Spots von geringer Intensität betrafen.

Qualitative Unterschiede ergaben sich für fünf Spots bei metabolisch markiertem Material und neun Spots nach Silberfärbung; sie sind mit Pfeilen in Abbildung 19 und 20 gekennzeichnet. Wie alle quantitativen erwiesen sich außer dem Spot 11 auch alle qualitativen Varianten als unabhängig vom Karyotyp des Klons, der sie zeigte.

Der Spot 11 (6,4/22 kD) wurde im autoradiographischen Muster der beiden XXY-Klone F87/K46 und F87/K10, der unklonierten Parental-Zelllinie F87 und in keiner der XX-Zelllinien festgestellt (siehe Tab. 5). Er wurde durch Silberfärbung bei allen Klonen erheblich stärker abgebildet und war hier vom etwas basischerem benachbarten Spot nicht mehr abzugrenzen; es ergaben sich höchstens Intensitätsunterschiede (siehe Abb. 20), die unabhängig vom Gonosomen-Gehalt der Klone waren.



Abb. 19: Vergleich des metabolisch markierten unfractionierten Zellmaterials eines XX-Klons (F87/K35; oben) und eines XXY-Klons (F87/K10; unten). Pfeile kennzeichnen zusätzliche Spots in jedem Muster. Erläuterung von Spot 11 unter 3.6.3.1.

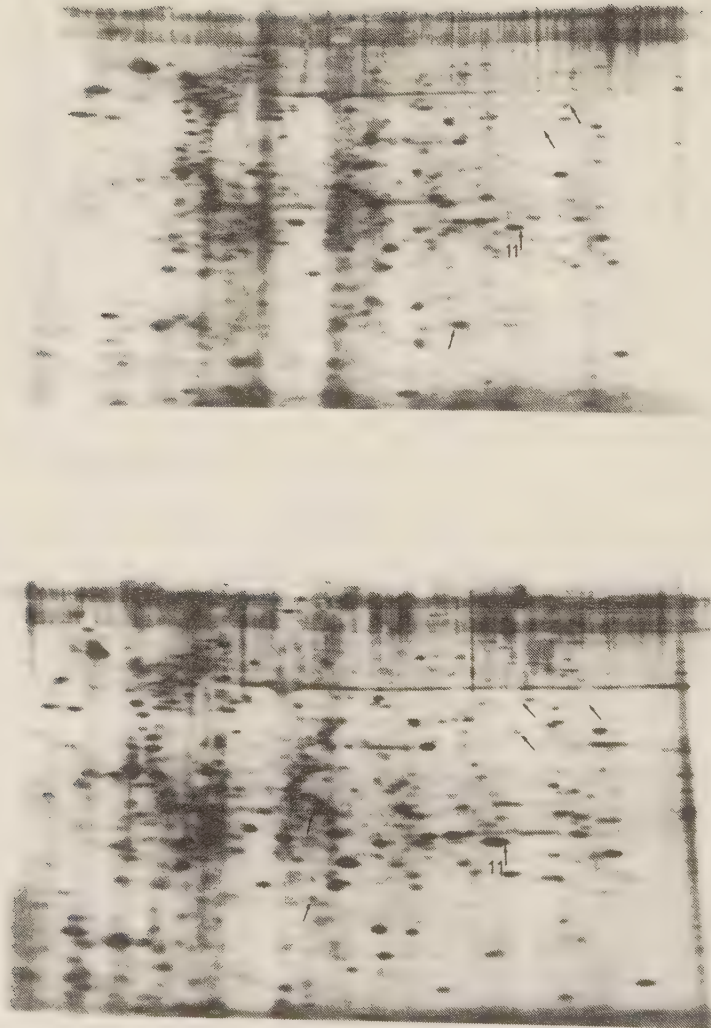


Abb. 20: Vergleich des nicht markierten unfractionierten Zellmaterials eines XX-Klons (F87/K47; oben) und eines XXY-Klons (F87/K46; unten) nach Silberfärbung. Pfeile kennzeichnen zusätzliche Spots in jedem Muster. Erläuterungen von Spot 11 unter 3.6.3.1.

3.6.3.2. 2D-Muster der tritonlöslichen Proteine

Die vergleichende Analyse der tritonlöslichen Proteine wurde wie unter 3.6.2.1. an den Mustern von radioaktiv markierten und unmarkierten Klonen durchgeführt.

In der autoradiographischen Auswertung sowie nach Silberfärbung wurde eine mit unfractioniertem Zellmaterial vergleichbare Anzahl von Varianten festgestellt, die zum Teil identische Spots betrafen.

In Abbildung 21 werden die insgesamt sieben qualitativen Varianten der radioaktiv markierten Proteinfractionen am Beispiel des Vergleichs der XX-Zelllinie F87/K47 mit der XXY-Zelllinie F87/K10 demonstriert. Die beiden Spots 12a (5,35/24,5 kD) und 12b (5,4/24 kD) standen offenbar in Zusammenhang: Bei den beiden XXY-Zelllinien F87/K10, F87/K1 und der parentalen Mosaik-Zelllinie F87 wurde der Spot 12b, bei dem XX-Klon F87/K47 und dem XXY-Klon F87/K46 der Spot 12a abgebildet (siehe Tab. 5). Die mit Silber gefärbten Proteinmuster zeigten in der Region der Spots 12a und 12b keine vergleichbaren Proteine. Die Untersuchung dieser Muster ergab zehn von den Autoradiographien zu unterscheidende qualitative Varianten, die in Abbildung 22 im Vergleich des XX-Klon F87/K62 mit dem XXY-Klon F87/K46 gekennzeichnet sind.

Neben den Spots 12a und 12b ergaben sich weder im autoradiographischen noch im silbergefärbten Muster tritonlöslicher Proteine weitere qualitative oder quantitative Varianten, deren Verteilung möglicherweise im Zusammenhang mit dem Gonosomen-Gehalt der Klone stand.

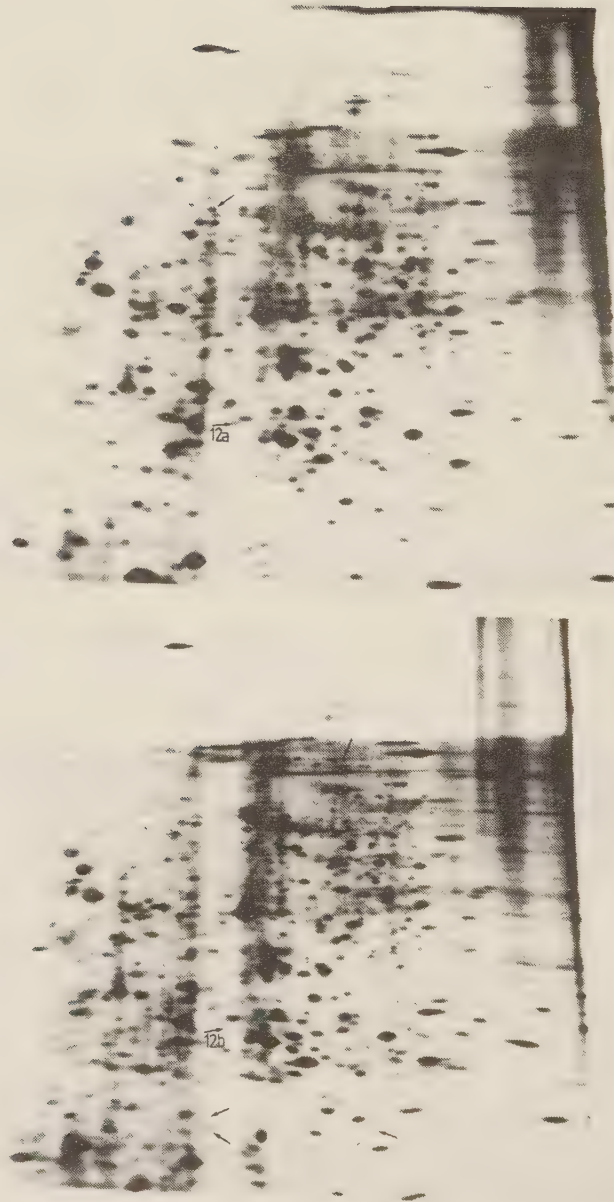


Abb. 21: Vergleich der metabolisch markierten tritonlöslichen Proteinfractionen eines XX-Klons (F87/K47; oben) und eines XXY-Klons (F87/K10; unten). Pfeile kennzeichnen zusätzliche Spots in jedem Muster. Erläuterungen der Spots 12a und 12b unter 3.6.3.2.

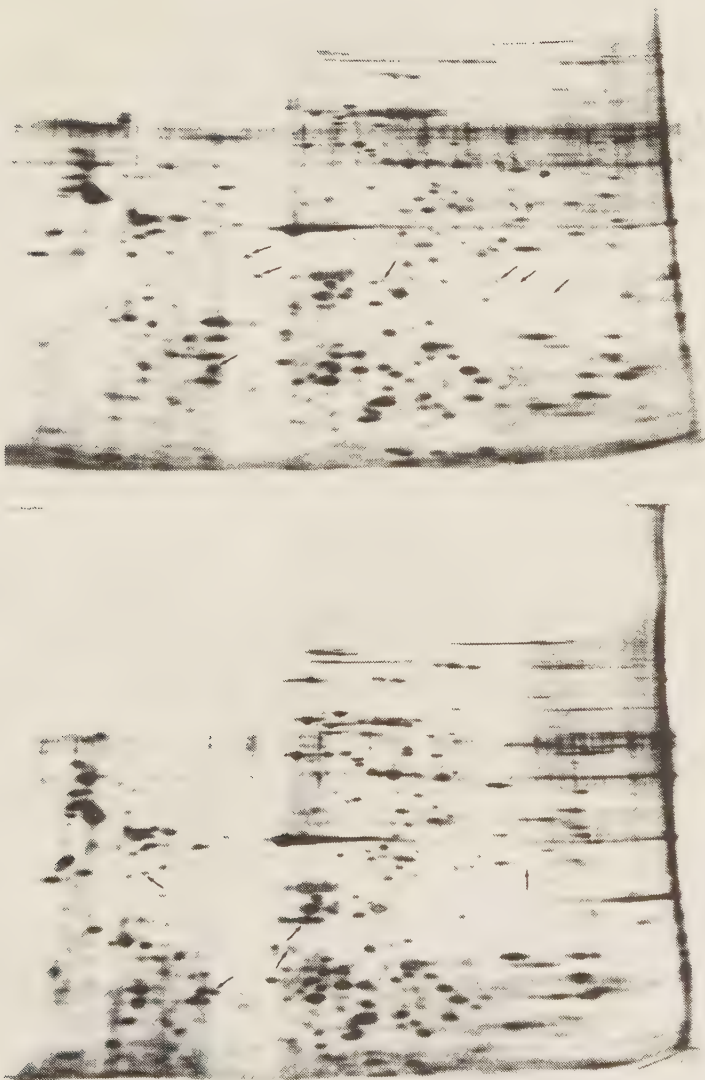


Abb. 22: Vergleich der nicht markierten tritonlöslichen Proteinfractionen eines XX-Klons (F87/K62; oben) und eines XXY-Klons (F87/K46; unten) nach Silberfärbung. Pfeile kennzeichnen zusätzliche Spots in jedem Muster.

3.6.4. Klone der Mosaik-Zelllinie F85 (46,xy/45,xo)

Die Zelllinie F85 stammte aus einer Biopsie vom Unterarm eines 19-jährigen Mädchen. In der Chromosomenanalyse wurden in 100 ausgewerteten mitotischen Zellen 38 Zellen mit dem Karyotyp 46,xy und 62 mit dem Karyotyp 45,xo festgestellt.

Die Klonierung ergab 26 Zelllinien, wovon dreizehn eindeutig Y-positiv und sieben Y-negativ waren. Die acht XY-Klone F85/K8, F85/K16, F85/K25, F85/K33, F85/K52, F85/K60 und F85/K76, sowie die fünf XO-Klone F85/K37, F85/K38, F85/K48, F85/K87 und F85/K88 wurden zur vergleichenden Analyse des totalen und tritonlöslichen Zellproteins verwendet. Sie wurden am vierten bis sechsten Tag nach der sechsten oder siebten Passage geerntet und präpariert.

3.6.4.1. 2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials

Der paarweise Vergleich von Klonen mit dem Karyotyp 46,xy und 45,xo ergab bei metabolisch markiertem Zellprotein unter über 400 Spots, bei unmarkiertem Zellmaterial für etwa 350 ausgewerteten Spots pro Muster ca. 25 Varianten. Für einzelne Spots bestand ein eindeutiger Zusammenhang der Abnahme an Intensität mit der stärkeren Abbildung eines weiteren Spots mit etwas unterschiedlichen pI-Wert bei geringerem Molekulargewicht.

Unter den sieben qualitativen Varianten (Abb. 23) in den autoradiographischen Mustern zeigte die Präsenz des Spots 13 (5,8/17 kD) eine Korrelation zum Karyotyp der klonierten Zelllinien: Er trat bei den vier XY-Klonen F85/K8, F85/K16, F85/K52, F85/K60 auf, fehlte jedoch bei den Y-negativen Klonen und bei der unklonierten Mosaik-Zelllinie F85 (siehe Tab. 5). Im Muster der unmarkierten Proteine wurde dieser Spot durch Silber nicht angefärbt.

Der Spot 11, der in den Vergleichen der F87-Klone nur bei XXY-Zelllinien zu sehen war, wurde im Muster aller XY- und XO-Klone von F85 abgebildet (siehe Abb. 23 und Tab. 5).

Im 2D-Muster des nicht markierten unfractionierten Zellmaterials wurden nach Silberfärbung weder unter den acht qualitativ varianten noch unter den einzelnen quantitativ varianten Spots Unterschiede festgestellt, die in Abhängigkeit vom Karyotyp der untersuchten F85-Klone auftraten.



Abb. 23: Vergleich des metabolisch markierten unfractionierten Zellmaterials eines XO-Klons (F85/K88; oben) und eines XY-Klons (F85/K16; unten). Pfeile kennzeichnen zusätzliche Spots in jedem Muster. Erläuterungen der Spots 11 und 13 unter 3.6.4.1.

3.6.4.2. 2D-Muster der tritonlöslichen Proteine

Die Gegenüberstellung der tritonlöslichen Proteinfractionen von XY- und XO-Klonen zeigte Variationen für etwa 25 aus ca. 400 autoradiographisch ausgewerteten Spots. Drei der neun qualitativen Varianten (siehe Abb. 25) fehlten auch im Muster der unklonierten Parental-Zelllinie F85 (Abb. 24) und stellen daher eher Zellwachstums- oder Präparationsartefakte dar.

Der Spot 12b (5,4/24 kD), der im Muster tritonlöslicher Proteine zweier XXY-Zelllinien gegenüber allen anderen F87-Klonen zusätzlich abgebildet wurde, war in den Mustern der F85-Klone von unterschiedlicher Intensität: Für die XY-Klone F85/K8, F85/K76 und F85/K86 wurde er stärker, für fünf weitere XY-Klone, drei XO-Klone und die unklonierte Zelllinie F85 schwächer abgebildet. Der Spot 12a (5,35/24,5 kD) zeigte in allen Fällen schwache Intensität und wurde bei den XY-Zelllinien F85/K86, F85/K60, den XO-Zelllinien F85/K48 und F85/K87 und der unklonierten Zelllinie F85 festgestellt. Die Verteilung dieser Varianten ist in Tab. 5 zusammengefaßt.

Im übrigen ergaben sich, ebenso wie für die ca. 20 varianten Spots unter etwa 300 im Muster unmarkierter tritonlöslicher Proteine, keine mit dem Gonosomen-Gehalt der Klone korrelierten Variationen.

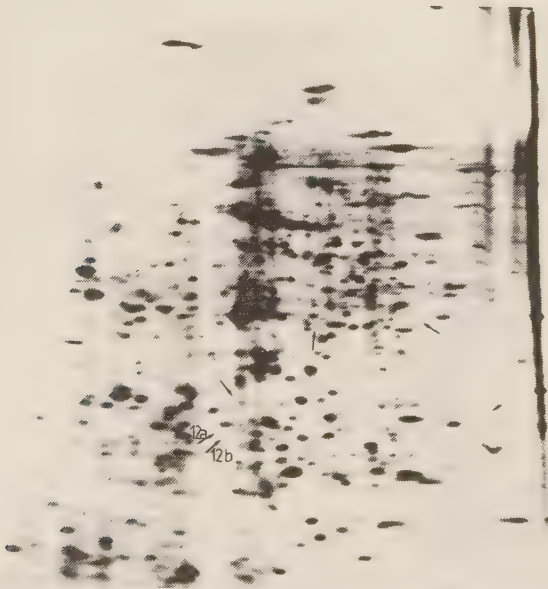


Abb. 24: Metabolisch markierte tritonlösliche Proteinfractionen der unklonierten Mosaik-Zelllinie F85 (46,xy/45,xo). Pfeile kennzeichnen Positionen von Spots, die gegenüber klonierten Zelllinien fehlen. Erläuterungen der Spots 12a und 12b unter 3.6.4.2.



Abb. 25: Vergleich der metabolisch markierten Proteinfraktionen eines XO-Klons F85/K88; oben) und eines XY-Klons (F85/K86; unten). Pfeile kennzeichnen zusätzliche Spots in jedem Muster. Erläuterungen der Spots 12a und 12b unter 3.6.4.2.

3.6.5. Zusammenfassung der Varianten bei klonierten Zelllinien

In Tabelle 5 sind alle Spots aufgeführt, die in den autoradiographisch ausgewerteten Proteinmustern der Klone aus den Mosaik-Zelllinien F85 (46,xy/45,xo) und F87 (46,xx/47,xy/48,xxy) in Zusammenhang mit dem Karyotyp der Zellen variierten. Das Fehlen einer Variante ist mit -, die durchschnittliche Intensität eines Spots mit +, die überdurchschnittliche mit ++ bezeichnet.

Der Spot 11 aus dem Vergleich des unfractionierten Zellmaterials der F87-Klone wurde bei sechs der XY-Klone aus F85 stärker als bei den beiden XXY-Klonen und zwei weiteren XY-Klonen abgebildet. Er fehlte bei allen XX-Klonen, war jedoch bei allen XO-Klonen aus F85 vorhanden. Im Muster der Mosaik-Zelllinie F86 und ihrer vier untersuchten XY-Klone trat er mit schwacher Intensität auf. In silbergefärbten Mustern unmarkierter Proteine war eine Abgrenzung dieses Spots von dem benachbarten, basischeren meist nicht möglich.

Der Spot 13, der im totalen Zellprotein von vier XY-Klonen gegenüber allen übrigen XY- und XO-Klonen zusätzlich auftrat, war im Muster einer XXY-Zelllinie und zweier XX-Zelllinien aus F87, sowie in allen vier XY-Zelllinien aus F86 zu sehen. Im Muster der unklonierten Parental-Zelllinien war er bei F86 vorhanden und fehlte bei F85 und F87.

Die qualitativen Varianten der Spots 12a und 12b im Muster der tritonlöslichen Proteine stehen in Verbindung zueinander: ein XX- und ein XXY-Klon zeigten nur den Spot 12a, zwei XXY-Klone, sechs XY-Klone und drei XO-Klone nur den Spot 12b. Bei zwei XY-Klonen wurden beide Spots mit etwa gleicher Intensität abgebildet. Bei drei XX-Klonen fehlten beide Spots.

In den autoradiographischen Mustern der klonierten Zelllinien wurde kein Spot eindeutig nur bei Klonen mit vorhandenem Y-Chromosom festgestellt. In Zusammenhang mit dem Karyotyp 46,xx schien das Fehlen des Spots 12b zu stehen.

Die vergleichende Analyse der mit Silber gefärbten Proteinmuster aus nicht markierten Zellen ergab keine Spots, deren Varianten möglicherweise korreliert mit dem Karyotyp der Klone auftraten.

	Klone der Mosaik- Zelllinie F 85 (46, xy/45, xo)										Klone der Mosaik-Zelllinie F 87 (46, xx/47, xxy/48, xxyy)				
Y-positive	F 85	K 8	K 16	K 25	K 33	K 52	K 60	K 76	K 86		F 87	K 1	K 10	K 46	
11	++	++	++	+	+	++	++	++	++		+	-	+	+	
13	-	+	+	-	-	+	+	-	-		-	-	-	+	
12a	+	-	-	-	-	-	+	-	+		-	-	-	+	
12b	+	++	+	+	+	+	+	++	++		+	+	+	-	
Y-negative		K 37	K 38	K 48	K 87	K 88					K 35	K 47	K 62	K 63	
11	+	+	+	+	++	++					-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	-					+	+	-	-	
12a	-	-	-	+	+	-					-	+	-	-	
12b	+	+	+	-	-	+					-	-	-	-	

Tab. 5: Variante Spots in den Proteinmustern von Klonen der Mosaik-Zelllinien F85 und F87.
 Unfunktionsiertes Zellmaterial: Spot 11 (6,4/22 kD), Spot 13 (5,8/17 kD)
 Tritonlösliche Proteine: Spot 12a (5,35/24,5 kD), Spot 12b (5,4/24 kD)

3-7. ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG DER VARIANTEN BEI UNKLONIERTEN UND KLONIERTEN ZELLINIEN

In Tabelle 6 sind die im Proteinmuster des unklonierten Zellmaterials Zelllinien-spezifisch varianten Spots aufgeführt und für klonierte und unklonierte Zelllinien zusammengefaßt. Für jeden Spot sind die Anzahl der Zelllinien desselben Karyotyps, deren 2D-Muster ihn zusätzlich beziehungsweise stärker ausgeprägt zeigten, sowie die Summe der untersuchten Zelllinien dieses Karyotyps angegeben.

Konzentrationsunterschiede sind bei den Spots p1a (5,8/45 kD), p1b (5,81/45 kD), p2 (5,6/27 kD), p4 (6,05/29 kD), p5 (6,05/28 kD), p6 (5,3/22 kD), 11 (6,4/22 kD) und 13 (5,8/17 kD) nicht berücksichtigt. Bei den quantitativ variierenden Spots p3 (5,9/63 kD) und p7 (5,25/20 kD) sind die Zelllinien aufgeführt, die den Spot mit stärkerer Intensität zeigten. Das Polypeptid p8 (6,2/37 kD), dessen Konzentration bei poly-X-Zelllinien höher konzentriert schien, das jedoch bei 22 unklonierten und allen klonierten Zelllinien fehlte, ist in der Tabelle nicht enthalten.

Die im Vergleich unklonierter Zelllinien festgestellten Proteine p1a, p1b, p2, p3, p4, p5 und p7 waren bei allen klonierten Zelllinien in gleicher Weise wie bei der entsprechenden parentalen Mosaik-Zelllinie variant. Die unterschiedliche Expression der Proteine p1a, p1b, p2, p3, p4 und p7 kann in Zusammenhang mit der individuellen Herkunft der Zelllinien gesehen werden und möglicherweise unter genetischer Kontrolle stehen. Eine höhere Konzentration des Proteins p7 ergab sich nur in Korrelation mit der Anwesenheit von mehr als zwei X-Chromosomen im Karyotyp.

Die Varianten des Proteins p6, das bei drei der F85-Klone fehlte, und des Proteins p5, die für Haut- und Lungenfibroblasten desselben Embryos unterschiedlich waren (siehe Tab. 3), können höchstens Zelllinien-spezifisch sein.

Die Verteilung der qualitativ variierenden Spots 11 und 13 aus den Vergleichen klonierter Zelllinien läßt darauf schließen, daß keiner der beiden mit dem Gonosomen-Gehalt der Zelllinien in Zusammenhang steht.

Die im Proteinmuster tritonlöslicher Proteine variierenden Spots sind in Tabelle 7 wie für Tabelle 6 beschrieben zusammengefaßt.

Die Verteilung des qualitativ varianten Proteins p2 (5,6/27 kD) entsprach bei allen untersuchten Zelllinien der in den Mustern des unfractionierten Zellmaterials.

Für die Proteine p9 (6,2/39 kD) und p10 (6,1/39 kD), die sowohl quantitativ variieren als auch fehlen konnten, sind die Spots mit schwacher Intensität als +, mit starker Intensität als ++ gekennzeichnet. Die Präsenz der beiden im 2D-Muster unklonierter Zelllinien festgestellten Spots stimmte bei allen Klonen mit der bei ihren parental-Mosaik-Zelllinien überein. Die bei zwei F85-Klonen schwächere Intensität von p9 war gekoppelt mit einem ebenfalls schwächeren Spot p10. Bei den F87-Klonen variierte die Konzentration des Proteins p9, p10 fehlte, wie bei der Parental-Zelllinie. Der Vergleich der unklonierten Zelllinien ergab einerseits in keinem Fall das Fehlen beider Proteine p9 und p10, andererseits war das Fehlen von p9 immer mit einer starken Konzentration von p10 gekoppelt (siehe Tab. 3).

Das Auftreten der qualitativ varianten Spots 12a (5,35/24 kD) und 12b (5,4/24 kD), deren Verteilung nach der Analyse der F87-Klone eine Y-Spezifität nicht ausschließen ließ, war bei den übrigen klonierten und unklonierten Zelllinien unabhängig von ihrem Gonosomengehalt.

Durch Silberfärbung des unmarkierten unfractionierten Zellmaterials wurde die Verteilung des Proteins p2 bestätigt, die übrigen varianten Spots waren in diesen Mustern nicht auszuwerten.

Die Varianten der Proteine p9 und p10 im Muster der tritonlöslichen unmarkierten Proteine, die für alle klonierten Zelllinien untersucht wurden, entsprachen denen im jeweiligen autoradiographischen Muster.

Keiner der varianten Spots in den Mustern metabolisch markierter oder unmarkierter Proteine aus unfractioniertem Zellmaterial und tritonlöslicher Proteinfractionen stand im Zusammenhang mit der An- oder Abwesenheit des Y-Chromosoms im Karyotyp der Zelllinien.

Karyotyp	p1a	p1b	p2	p3	p4	p5	p6	p7	I1	I3
unklonierte Zelllinien										
46, xx	5/7	4/7	1/7	2/7	3/7	5/7	2/7	0/7	3/7	6/7
46, xy	8/10	8/10	2/10	6/10	6/10	5/10	8/10	0/10	7/10	10/10
45, xo	4/6	5/6	1/6	2/6	3/6	4/6	2/6	0/6	4/6	5/6
47, xxx	2/2	1/2	0/2	1/2	2/2	0/2	1/2	2/2	0/2	0/2
48, xxxx	2/2	1/2	0/2	1/2	2/2	0/2	1/2	2/2	0/2	0/2
47, xxy	1/3	2/3	1/3	2/3	2/3	1/3	1/3	0/3	3/3	3/3
49, xxxxy	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
47, xyy	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
Klonierungen										
Mosaik F 85	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1
46, xy/45, xo	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1
Klone	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	8/8	7/8	0/8	8/8	4/8
46, xy	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	8/8	7/8	0/8	8/8	4/8
Klone	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	3/5	0/5	5/5	0/5
45, xo	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	3/5	0/5	5/5	0/5
Mosaik F 87										
46, xx/47, xxy/	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1
48, xxyy	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1
Klone	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	2/4
46, xx	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	2/4
Klone	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	2/3	1/3
47, xxy	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	2/3	1/3
Mosaik F 86										
46, xy/45, xo	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Klone	4/4	0/4	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	0/4	4/4	4/4
46, xy	4/4	0/4	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	0/4	4/4	4/4

Tab. 6: Variante Proteine und Spots im 2D-Muster des unfractionierten metabolisch markierten Zellmaterials aus unklonierten und klonierten Zelllinien. Die Zahlenkombinationen geben die Anzahl der entsprechenden Varianten pro Anzahl der untersuchten Zelllinien an (weitere Erläuterungen unter 3.7.).

Karyotyp	p2	p9+	p9++	p10+	p10++	12a	12b
unklonierte Zelllinien							
46, xx	1/7	1/7	3/7	1/7	5/7	4/7	1/7
46, xy	2/10	3/10	2/10	3/10	5/10	6/10	8/10
45, xo	1/6	2/6	3/6	1/6	2/6	4/6	2/6
47, xxx	0/2	0/2	2/2	1/2	1/2	1/2	2/2
48, xxxx							
47, xxy	1/2	0/2	2/2	0/2	1/2	2/2	2/2
49, xxxxy	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1
47, xyy	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1
Klonierungen							
Mosaik F 85 46, xy/45, xo	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1
Klone 46, xy	0/8	2/8	6/8	2/8	6/8	2/8	8/8
Klone 45, xo	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	2/5	3/5
Mosaik F 87 46, xx/47, xxy/ 48, xxyy	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
Klone 46, xx	0/4	3/4	1/4	0/4	0/4	1/4	0/4
Klone 47, xxy	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3	1/3	2/3
Mosaik F 86 46, xy/45, xo	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1
Klone 46, xy	nicht untersucht						

Tab. 7: Variante Proteine und Spots im 2D-Muster tritonlöslicher metabolisch markierter Proteine aus unklonierten und klonierten Zelllinien. Die Zahlenkombinationen geben die Anzahl der entsprechenden Varianten pro Anzahl der untersuchten Zelllinien an (weitere Erläuterungen unter 3.7.).

3.8. ERGEBNISSE DER IMMUNPRÄZIPITATION

Im Rahmen der Vorversuche zur vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der spezifischen Immunpräzipitation mit sogenannten H-Y Antiseren aus der Maus geprüft: Aus männlichen und weiblichen Inzucht-Mäusen wurden Lymphozyten wie unter 2.7.1. beschrieben gewonnen und aufbereitet. Als positive Kontrolle der Immunadsorptionschromatographie (siehe 2.7.3.) diente der Nachweis des geschlechtsunabhängigen I-A^k Antigens aus radioaktiv markierten Lymphozyten der Maus-Inzuchtstämme C3H und AKR. Durch Präzipitation mit einem von Dr. K. Reske - Institut für Immunologie der Universität Mainz - freundlicherweise zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper (10-2.16, Salk Institute, San Diego) wurden drei Untereinheiten des I-A^k Antigen-Komplexes angereichert (Abb. 25): Nach Zecher und Reske (1982) sind die drei Hauptbanden zu interpretieren als die α -Polypeptidkette bei 35 kD, die γ -Kette bei 32 kD und die β -Ketten bei 31 kD. Weitere schwächere Banden von nicht spezifisch gebundenen Plasmamembranproteinen sind sichtbar und zum Teil auch im Eluat nach Inkubation mit Nicht-Immuns serum enthalten.

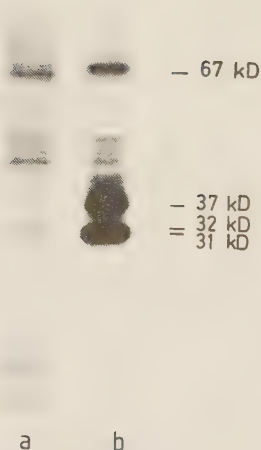


Abb. 25: Autoradiographischer Nachweis des I-A^k Antigens aus ³H-Leuzin-markierten Lymphozyten von AKR-Mäusen durch Immunpräzipitation mit monoklonalem Antikörper (Expositionszeit vier Wochen).

- a) Eluat nach Inkubation mit Nicht-Immuns serum
- b) Eluat nach spezifischer Immunadsorption mit monoklonalem I-A^k Antikörper

3.8.1. Polyklonale H-Y Antiseren

In den Plasmamembranpräparationen aus ca. 2×10^7 Lymphozyten von C57Bl/6J Mäusen wurde ein durchschnittlicher Einbau von 4×10^6 cpm bei metabolischer Markierung mit ^3H -Leuzin bzw. 1×10^7 cpm für ^{35}S -Methionin gemessen. Das gesamte hieraus nach Immunadsorptionschromatographie von der Protein A-Sepharose-Säule eluierte Material wurde auf die Gele der eindimensionalen Elektrophorese aufgetragen. Abbildung 26 zeigt das Bandenmuster der Plasmamembranpräparationen von ^3H -Leuzin markierten Lymphozyten aus weiblichen und männlichen Mäusen sowie die entsprechenden Eluate nach Immunpräzipitation mit einem polyklonalen H-Y Antiserum. Die stark verdünnt aufgetragene Plasmamembranfraktion wies zahlreiche Banden im aufgetrennten Molekulargewichtsbereich von ca. 100 kD bis 10 kD auf. Bei den Eluaten war lediglich eine Komponente von 48 kD abgebildet, die keinerlei geschlechtsspezifische Unterschiede zeigte und auch im Muster der Eluate nach Präzipitation mit Nicht-Immunsereen zu sehen war (siehe Abb. 27 und 28). Auch die Analyse des an der Säule nicht haften gebliebenen Plasmamembranmaterials ergab für männliche Zellen keine fehlende Komponente, die den Schluß zuließe, daß diese an der Säule spezifisch gebunden worden wäre.

Dieser Befunde entspricht dem Ergebnis von 15 weiteren Versuchen mit Lymphozyten aus metabolischen Kurzzeit- und Langzeitmarkierungen mit ^3H -Leuzin und ebensolchem Material nach ^{35}S -Markierung, sowie einem Versuch mit humanen Lymphozyten. Auch für die Präparationen aus Lymphoblasten, die durch allogeneische Stimulierung der C57Bl/6J Mäuse erzeugt wurden (in vivo-Stimulierung mit Lymphozyten des Mausstammes AKR, drei Wochen Suspensionskultur mit Interleukin 2), ergaben die gelelektrophoretischen Analysen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Abb. 27): Durch die Verwendung von ^{35}S -Methionin-markiertem Material sind in diesem Fall schwache Banden etwas deutlicher. Das Eluat von weiblichem und männlichem Material nach Präzipitation mit dem H-Y Antiserum zeigt ein identisches Bandenmuster mit wenig Unterschieden zum Eluat der vorangegangenen Adsorptionschromatographie mit nicht-immunem Mausserum.

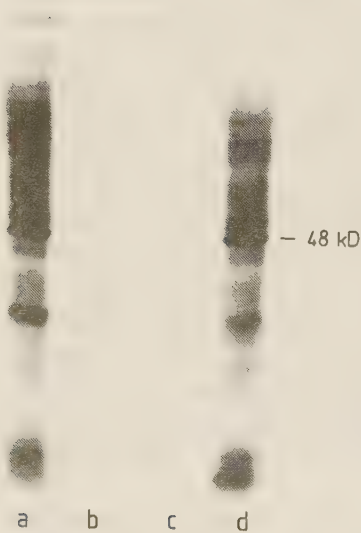


Abb. 26: Darstellung der ^3H -Leuzin-markierten Plasmamembranproteine aus peripheren Lymphozyten von C57Bl/6J Mäusen und des Eluats nach spezifischer Immunadsorptionschromatographie mit polyklonalem H-Y Antiserum. (Expositionszeit sechs Wochen)

- a) weibl., Plasmamembranfraktion
- b) weibl., Eluat
- c) männl., Eluat
- d) männl., Plasmamembranfraktion

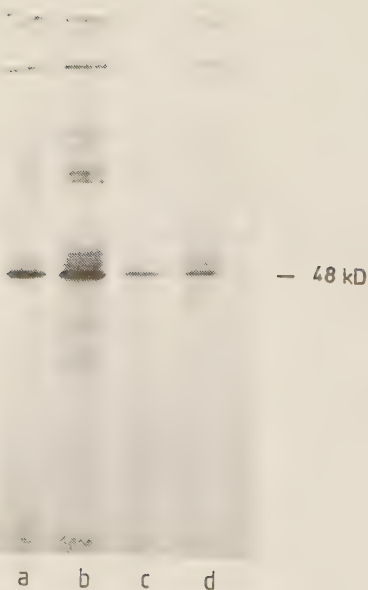


Abb. 27: Eluate der Immunadsorptionschromatographie mit Plasmamembranfraktionen von allogeneisch stimulierten, ^{35}S -Methionin-markierten Lymphoblasten aus C57Bl/6J Mäusen und polyklonalem H-Y Antiserum. (Expositionsszeit drei Wochen)

- a) weibl., nach Reaktion mit Nicht-Immunserum
- b) männl., nach Reaktion mit Nicht-Immunserum
- c) weibl., nach spezifischer Immunadsorption
- d) männl., nach spezifischer Immunadsorption

Unmarkierte Lymphozyten ohne Kultivierungsphase wurden in 20 Versuchen der Immunadsorptionschromatographie mit polyklonalen H-Y Antiseren verwendet. Die Bandenmuster der Eluate dieser Säulen waren vergleichsweise komplexer, da ihre Darstellung durch Silberfärbung erfolgte, wodurch auch alle ebenfalls eluierten Komponenten des Antiserums abgebildet wurden.

Auch in diesen Analysen konnte kein eindeutiger Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Plasmamembranen nachgewiesen werden. Lediglich in acht Versuchen, und somit nur bedingt reproduzierbar, ergab sich für eine Bande mit dem Molekulargewicht von 30 kD bei Eluaten von männlichem Material eine etwas stärkere Ausprägung als bei solchen von weiblichem Material.

3.8.2. "Monoklonale H-Y Antiseren"

Die Immunadsorptionschromatographie mit "monoklonalem H-Y Antiserum" wurde mit der unter 2.7.3. beschriebenen Modifikation der "Sandwich"- Technik durchgeführt.

Abb. 28 zeigt die Eluate der Präzipitationen von weiblichem und männlichem Lymphozytenmaterial aus C57Bl/6J Mäusen, die zunächst mit nicht-immunem Mäuseserum und anschließend mit "monoklonalem H-Y Antiserum" erfolgten. Die in diesem Fall besonders effektive metabolische Markierung ergab für alle Eluate ein gegenüber den anderen Darstellungen deutlicheres Bandenmuster. Auffallend war die hohe Konzentration von Proteinen mit Molekulargewichten bei 67 kD in den Eluaten nach spezifischer Präzipitation, die jedoch in schwächerem Ausmaß ebenfalls vom nicht-immunen Mäuseserum in allen Versuchen gebunden worden war. Auch durch Immunpräzipitation mit dem Kontroll-Antiserum gegen I-A^k Antigene wurden diese Proteine angereichert (siehe Abb. 25). Die bei männlichem Material vor allem nach Reaktion mit nicht-immunem Serum starke Bande bei 54 kD sowie zwei weitere Banden in allen vier Eluaten bei 25 kD und 23 kD liegen hinsichtlich ihrer Molekulargewichte im Bereich der schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen. Sie wurden anscheinend durch die angewendete "Sandwich"-Technik gegenüber den Versuchen mit polyklonalen Antiseren zusätzlich angereichert.

In vier Versuchen dieser Art sowie einer Präzipitation mit humanen Lymphozyten konnten auch unter Verwendung des monoklonalen Antiserums Nr. 12-49-29;1/14/80 keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden.

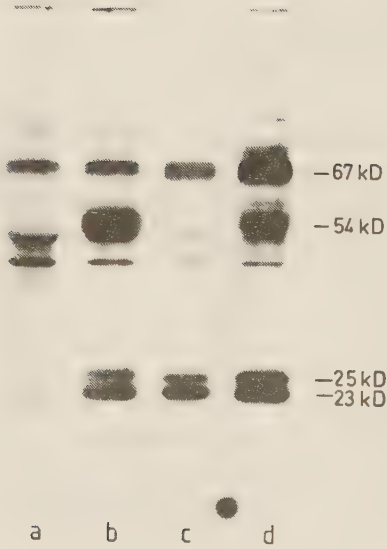


Abb. 28: Eluate der Immunadsorptionschromatographie mit "monoklonalem H-Y Antiserum" und der Plasmamembranfraktion aus peripheren, mit ^3H -Leuzin markierten Lymphozyten von C57Bl/6J Mäusen. (Expositionszeit acht Wochen)

- a) weibl., nach Reaktion mit Nicht-Immunserum
- b) männl., nach Reaktion mit Nicht-Immunserum
- c) weibl., nach spezifischer Immunadsorption
- d) männl., nach spezifischer Immunadsorption

4. DISKUSSION

4.1. PROTEINMUSTER DER ZELLPRÄPARATIONEN

Durch die gewählten Präparationsverfahren wurden sowohl für das unfractionierte Zellmaterial als auch für die tritonlöslichen und zytoskeletalen Fraktionen definierte und bei allen Zelllinien vergleichbare 2D-Proteinmuster erreicht.

Die Anzahl der mit der vergleichenden Analyse erfaßbaren Proteine wurde erweitert durch modifizierte Vorbehandlung der Fibroblasten in Zellkultur und die Darstellung der Proteinmuster durch Autoradiographie und Silberfärbung: Die zur autoradiographischen Auswertung kultivierten Zellen erhielten während ihrer metabolischen Markierungsphase mit ^3H -Leuzin frisches Serum im Kulturmedium. Nach den Ausführungen von Macieira-Coelho (1973) mußten diese Zellen, im Gegensatz zu den nicht markierten, die sich durch Serumentzug vornehmlich in der G_0 -Phase des Zellzyklus befanden, zusätzlich die in der G_1 - und S-Phase neu synthetisierten Polypeptide enthalten. Sowohl aus dieser Differenzierung als auch aus den beiden Darstellungsmethoden der aufgetrennten Proteinfractionen resultierten einige unterschiedlich abgebildete Spots in den ansonsten vergleichbaren 2D-Mustern.

Als sensitivere Methode der Auswertung erwies sich die Autoradiographie, die sehr schwache Spots sowie Konzentrationsunterschiede von Proteinen eindeutiger feststellen ließ. Durch Silberfärbung wurden auch solche Polypeptide einbezogen, die unter den gewählten Bedingungen mit der metabolischen Markierung nicht erfaßt wurden. Färbetechnische Besonderheiten erschwerten die Analyse von einigen quantitativen Unterschieden und von Proteinen mit Molekulargewichten bei 57 kD und 51 kD sowie über 80 kD.

Mit bis zu 600 Spots pro 2D-Muster des unfractionierten Zellmaterials lag die Anzahl der dargestellten Proteine im Bereich der meisten veröffentlichten 2D-Analysen von totalem Zellprotein verschiedener Zelltypen.

Eine größere Menge von Spots wurde durch metabolische Markierung mit mehreren verschiedenen radioaktiven Aminosäuren (Klose et al., 1980), die Verwendung von Gelen mit überdurchschnittlicher Länge (Klose, 1983), oder mit unterschiedlichen Polyacrylamid-Konzentrationsgradienten in der zweiten Dimension (Garrels, 1979) und die Erstellung von mehreren Gelen pro Präparat, deren erste Dimension einzelne pI-Bereiche stärker auftrennen (Garrels, 1979), erreicht; dies machte jedoch eine

computergesteuerte Auswertung unumgänglich. Auf diese Möglichkeiten wurde zugunsten einer zusätzlichen differenzierteren Proteinextraktion sowie einer größeren Stichprobe von untersuchten, unklonierten und klonierten Zelllinien verzichtet.

Die Verteilung und relative Intensität der Spots im Muster beider Darstellungsmethoden von totalem Zellprotein der Fibroblasten entsprach der in den 2D-Analysen anderer Autoren (Weil und Epstein, 1979; Walton et al., 1979; Kondo et al., 1984; Müller et al., 1984). In allen Fällen waren Differenzen hinsichtlich der Präsenz und Position einzelner schwächer ausgeprägter Spots auf Grund unterschiedlicher Labormethoden möglich.

Verschiedene intensiv abgebildete Spots, die auch in den vorliegenden Untersuchungen größtenteils der zytoskeletalen Zellfraktion zugeordnet wurden (siehe 3.3.2.), können durch Vergleich mit Untersuchungen von Autoren, denen die Identifikation solcher Spots durch spezifische Antikörper, Peptid-Mapping oder Coelektrophorese gelang, folgendermaßen interpretiert werden: Neben dem Spot von Aktin (bei 5,6 - 5,7/42 kD, nach Leavitt und Kakunaga, 1980), der auch in dieser Arbeit identifiziert wurde, handelt es sich bei den Spots im pI-Bereich 5,3 - 5,0 mit Molekulargewichten von 52 kD bis 48 kD offenbar um Abbildungen der α - und β -Tubuline und des Vimentins sowie seiner Phosphorylierungs- und Abbauprodukte (Bravo et al., 1982). Im Bereich dieser Proteingruppen wurden in den vorliegenden Untersuchungen augenfällige Intensitätsunterschiede der Spots vor allem zwischen unklonierten und klonierten Zelllinien festgestellt. Da ihre Expression und Modifikation nach den Ergebnissen von Bravo et al. (1982) abhängig von den Zellzyklus-Phasen ist, stehen diese Differenzen vermutlich im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Wachstum der Zelllinie. Die Spots mit den Werten 4,80/38 kD, 4,85/36 kD, 4,85/34 kD, und 4,80/31 kD stellen die Hauptproteine der Tropomyosine dar (Talbot und MacLeod, 1983). Das größte der vier Proteine zeigte in den 2D-Analysen klonierter Zelllinien (Giometti et al., 1985) drei verschiedene Spot-Varianten. Bei gleichem pI-Wert lag mit etwas größerem Molekulargewicht der Spot von Cyclin, dessen Ausprägung nach Celis et al. (1984) abhängig vom Zellzyklus und der Anzahl der Zellpassagen ist.

Für schwächere Spots sind nur in seltenen Fällen Identifikationen bekannt (Cox et al., 1981; Kondo et al., 1984; Anderson, 1985); solche Proteine waren in den durchgeführten Analysen auf Grund ihres pI-Wertes nicht zu finden oder bezüglich ihrer Lage nicht eindeutig zu vergleichen.

Durch Spot-Reihen mit Molekulargewichten über 80 kD wurden möglicherweise Zelloberflächen-Proteine mit Funktionen als Rezeptorproteine oder Zell-Zell-Erkennungsfaktoren dargestellt (siehe 1.2.1.).

Grundsätzlich existiert bislang kein allgemeiner Proteinindex für die 2D-Proteinmuster von Fibroblasten, der durch einheitliche Bezeichnung aller Spots und Zuordnung ihrer pI- und MG-Werte weitere Vergleiche zuließe. Erste Ansätze hierzu zeigen Bravo und Celis (1984) im Katalog der HeLa-Proteine, in dem alle auch bei Fibroblasten vorhandenen Proteine vermerkt sind.

Die 2D-Muster der tritonlöslichen und zytoskeletalen Proteine beweisen eine deutliche Trennung der beiden Zellfraktionen.

Unter den 15 überdurchschnittlich stark abgebildeten Komponenten des triton-unlöslichen Zytoskeletts befanden sich die wie oben beschrieben identifizierten Proteine Aktin, Tropomyosine, Vimentin und Tubuline, die die Hauptbestandteile der Mikrofilamente, intermediären Filamente und der Mikrotubuli bilden (siehe 1.2.). Die Analyse dieser Zellfraktion wurde zur Kontrolle des Zellwachstums eingesetzt. Auf Grund der für die Zelle lebensnotwendigen Funktion für die meisten Komponenten und ihrer prinzipiell sehr selten auftretenden qualitativen Varianten (Klose et al., 1983) wurde sie zur Suche nach geschlechtsspezifischen Spot-Varianten nicht herangezogen.

Die Präparation der tritonlöslichen Proteinfraction ergab in allen Fällen einen höheren Wert an Tritium-markiertem Protein, als die des totalen Zellproteins. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der höheren Ladungskapazität für die schwächer konzentrierten Proteine bei Abwesenheit des stark konzentrierten Zytoskelettanteils. Sie ergab gut reproduzierbare Proteinmuster, in denen einige Spots zusätzlich zum Muster des unfractionierten Zellmaterials auftraten. Unter Berücksichtigung der unterschiedlich gewählten Polyacrylamid-Konzentrationsgradienten der zweiten Dimension war eine Übereinstimmung mit den 2D-Analysen von Leavitt und Kakunaga (1980) festzustellen.

4.2. ZELLINIEN-SPEZIFISCHE VARIANTEN

Die vergleichende Analyse der Proteinmuster beider Zellpräparationen aller Zelllinien zeigte qualitative und quantitative Variationen für verschiedene Spots. Solche Varianten stellen Ladungs- und/oder Molekulargewichtsunterschiede dar, die transkriptional und posttranskriptional, durch Genduplikation, allelische Heterogenität und Phosphorylierung, Azetylierung, Methylierung oder Glykosylierung der Polypeptide entstehen (siehe 1.2.).

Um den festgestellten Spot-Varianten eine Zelllinien-Spezifität und möglicherweise einen genetischen Hintergrund zuzuschreiben, müssen artifizielle Unterschiede berücksichtigt werden. Dies war in der vorliegenden Arbeit zum Teil durch verschiedene Präparationen derselben Zelllinie möglich. Einerseits muß mit der Imitation der beschriebenen genetisch bedingten Varianten durch in vitro-Modifikationen, wie zum Beispiel dem Abbau durch Proteasen, der spontanen Desaminierung von Asparagin und Glutamin, der Oxidation von Proteinen und der Carbamylierung durch Harnstoff in der Probe gerechnet werden. Andererseits sind mit Sicherheit einige Varianten als Zellkultur-abhängig einzustufen. Singh et al. (1981) beschreiben den Einfluß verschiedener Zellkultur-Parameter, wie zum Beispiel Zelldichte, Zellpassage, Mediumkomponenten (auch unterschiedliche Chargen desselben Serums) und Sauerstoffdruck auf das Proteinmuster von kultivierten Fibroblasten. Ivarie und O'Farrell (1978) wiesen je nach Zelldichte Änderungen der basischen Proteine bei Hepatomzellen nach. Anderson et al. (1984) ziehen zur computergesteuerten Auswertung der 2D-Muster von kultivierten Fibroblasten nur 89 Spots als zuverlässig auftretend heran.

Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei den einzelnen untersuchten Zelllinien Fibroblasten-Subpopulationen unterschiedlichen Typs kultiviert wurden. So wiesen Harper und Grove (1979) unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten für morphologisch identische Fibroblasten je nach ihrer Herkunft aus der papillären oder retikulären Region der Dermis nach. Er gibt einen Überblick über funktionelle und enzymatische Unterschiede der beiden Zelltypen sowie über weitere von anderen Autoren festgelegte, qualitative Differenzierungen zwischen Subpopulationen aus derselben Biopsie. Beverstock (1984) weist in der Zusammenfassung des Wachstums von Fibroblasten in Kultur auch auf die Bedeutung der Entnahmestelle der Hautbiopsie hin. Moll et al. (1982) unterschieden anhand von 2D-Analysen der Cytokeratine mindestens sieben Zelltypen in der Haut, wobei hier allerdings auch Zellen der Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen eingeschlossen waren.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten im unfractionierten Zellmaterial von 33 unklonierten Zelllinien unter über 400 ausgewerteten Spots die neun zelllinienspezifisch varianten Polypeptide p1a (5,8/45 kD), p1b (5,81/45 kD), p2 (5,6/27 kD), p3 (5,9/63 kD), p4 (6,05/29 kD), p5 (6,05/28 kD), p6 (5,3/22 kD), p7 (5,25/20 kD) und p8 (6,2/37 kD).

Das Auftreten der Spots von p1a und p1b war in einer Weise korreliert, die durch unterschiedliche posttranskriptionale Modifikation eines Proteins erklärbar wäre. Ebenfalls in Zusammenhang standen die Spots von p4 und p5, die durch zwei Allele eines Gens für dasselbe Protein entstanden sein könnten. Die Variation von p5 war bei Haut- und Lungengewebe, die des Proteins p6 bei klonierten Zelllinien derselben Parentalzelllinie unterschiedlich abgebildet.

Somit können unter Ausschluß von gewebs- und subpopulationsspezifischen Varianten höchstens zwei qualitativ (p1a/b, p2) und drei quantitativ variante Polypeptide (p3, p7, p8) als individuelle Unterschiede mit möglichem genetischen Hintergrund angesehen werden.

Im Muster der tritonlöslichen Proteine wurden unter über 400 Spots drei qualitativ variante Proteine festgestellt. Der Spot von p2 stimmte bezüglich seiner Lage im 2D-Muster und der An- und Abwesenheit bei den einzelnen Zelllinien mit denen für totales Zellprotein beschriebenen überein. Unter Annahme eines genetischen Hintergrundes schien es sich bei den korreliert variierenden Proteinen p9 (6,2/39 kD) und p10 (6,1/39 kD) um posttranskriptional modifizierte Formen eines Polypeptids zu handeln.

Bei Untersuchungen von 33 Zelllinien fanden sich sowohl bei unfractioniertem Zellmaterial als auch bei den tritonlöslichen Proteinen qualitative Unterschiede im 2D-Muster bei etwa 1% der Spots. Dieses Ergebnis lag im Bereich der von anderen Autoren ermittelten Variabilität: Walton et al. (1979) stellte bei fünf humanen Fibroblasten-Zelllinien für 1,2% qualitative Spot-Varianten fest, McConkey et al. (1979) bei vier Zelllinien ca. 0,5%, Giometti und Anderson (1981) bei 12 Zelllinien 1% und Klose et al. (1983) im totalen Zellprotein sowie in der löslichen Zellfraktion von Fibroblasten aus 23 Personen jeweils weniger als 1%.

Der Anteil an quantitativen Varianten lag in einigen Fällen über den hier gefundenen, was zum Beispiel im Falle der Untersuchungen von Klose et al. (1983) auf die computergesteuerte Auswertung der Muster zurückzuführen ist, die in der Lage ist, erheblich schwächere Intensitätsunterschiede der Spots zu erfassen.

Die Verteilung der varianten Spots der Proteine p1a/b, p2, p3, p4, p5, p6, p9 und p10 war in den untersuchten Fällen unabhängig vom Gonosomen-Gehalt der Zelllinien (siehe 4.5.), die der Proteine p7 und p8 war möglicherweise korreliert mit der Anzahl der X-Chromosomen (siehe 4.3.). Keine der Varianten stand im Zusammenhang mit dem Alter des Fibroblasten-Spenders oder der Anzahl der vor der Zellernte erfolgten Passagen.

Eine weiterführende Analyse des genetischen Hintergrundes dieser Proteinvarianten wäre nur durch ausgedehnte Familienuntersuchungen möglich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden; ohne diese können zellinienspezifische Wachstumsunterschiede als Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Im Bezug auf gewebsspezifische Unterschiede ergab die vergleichende Untersuchung von Zelllinien aus Haut- und Lungengewebe neben schnellerem Zellwachstum und höherer Stoffwechselaktivität bei Lungenfibroblasten mehrere quantitativ differenzierbare Spots, was im Einklang mit den Ergebnissen von Schneider et al. (1977) und Mc Conkey (1979) steht. Zusätzlich zur Abwesenheit der Proteine p4 und p5 in beiden Lungen-Zelllinien schienen keine weiteren qualitativen Unterschiede zu Hautfibroblasten vorzuliegen.

In stärkerem Maße waren sich die Fibroblasten vom Oberarm und Skrotum desselben Säuglings ähnlich, deren Proteinmuster sich nur durch wenige quantitative variante Spots unterschieden, die offenbar Zellkultur-abhängig auch zwischen Hautfibroblasten variieren konnten.

4.3- GONOSOMAL ABERRANTE ZELLINIEN

Die Proteinmuster der 13 gonosomal aberranten Zelllinien, die sich gegenüber normalen durch zusätzliche oder fehlende Geschlechtschromosomen auszeichnen, ergaben vor allem bei unfractioniertem Zellmaterial eine vergleichsweise hohe Anzahl varianter Spots. Dies steht offenbar in Zusammenhang mit den bei diesen Zelllinien grundsätzlich stärkeren Wachstumsunterschieden, die sich jedoch für keinen aberranten Karyotyp verallgemeinern ließen.

Die 2D-Analyse zeigte mit Ausnahme von p7 und möglicherweise p8 keine systematischen, für den jeweiligen gonosomal aberranten Karyotyp spezifischen Unterschiede. Auch Anderson et al. (1984) konnte bei 63 Fibroblasten-Zelllinien von gesunden und genetisch bedingt kranken Personen, unter denen sich ein XO-Turner- sowie ein XXXXY-Klinefelter-Patient befanden, keine der durch Computer-Auswertung gefundenen 10 qualitativen Varianten einem Krankheitsbild spezifisch zuordnen.

Die drei Zelllinien, deren Karyotyp mehr als zwei X-Chromosomen aufwies, wurden zur Suche nach X-codierten Proteinen verwendet; sie konnten im Rahmen der Untersuchungen entdeckt werden, sofern sie von einem Gen auf dem nicht-inaktivierten Teil des X-Chromosoms codiert werden und das Y-Chromosom keine in gleichem Maße abgelesene Kopie trägt.

Ein derartiges Protein stellte p7 (5,3/20 kD) dar, dessen Spot bei den beiden poly-X-Zelllinien und der XXXXY-Zelllinie durch stärkere Intensität in den 2D-Mustern beider Zellfraktionen gegenüber allen anderen Zelllinien auffiel. Das Protein p8 kommt als solches nur mit Einschränkungen in Frage, da es zwar bei den beiden poly-X-Zelllinien am stärksten abgebildet war, jedoch nur bei einigen der anderen Zelllinien vorgefunden wurde.

Das Protein p7 scheint auf Grund seines pI- und MG-Wertes mit keinem der X-codierten Proteine identisch, die durch 2D-Analyse von Zellhybriden festgestellt wurden (Cox et al., 1981; Taggart und Francke, 1982; Müller und Voiculescu, 1984). Ähnlichkeiten mit den durch Antikörper identifizierten X-codierten Zelloberflächen-Antigenen 12 E7 (Goodfellow und Tippet, 1981) und o13 (Drapopoli et al., 1985), die unter 1.1.5. beschrieben werden, sind nicht auszuschließen. Allerdings fehlen vergleichbare 2D-Analysen.

Den 2D-Mustern von XO-Zelllinien sollten gegenüber XY-Zelllinien eventuell vom Y-Chromosom codierte oder regulierte Proteine fehlen, bei XYY-Zelllinien könnten solche als stärker abgebildete Spots auffallen.

Für das hierbei in Frage kommende, als Y-Chromosom-abhängig diskutierte HY-Antigen besteht trotz der Unterscheidung von SDM- und CD-Antigen eine erhebliche Diskrepanz der bisherigen Ergebnisse: nach serologischen H-Y Tests an Zellen von Mäusen und Menschen (siehe 1.1.1.) müßte bei XO-Zelllinien eine gegenüber XY-Zellen schwächere (Wolf et al., 1980b; Engel, 1981a) oder fehlende (Casanova-Bettane und Fellous, 1981; Haseltine et al., 1982) H-Y Expression vorliegen. Nach Tests mit der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität (siehe 1.1.1. und 1.1.2.) sollte das H-Y Antigen bei XO-Zelllinien fehlen (Celada und Welshons, 1963; Simpson, 1982) oder vorhanden sein wie bei Koo et al. (1983) und Wiberg (1985).

In den vorliegenden Untersuchungen wurden keine Protein-Spots festgestellt, die bei allen sechs XO-Zelllinien gegenüber Y-positiven Zelllinien fehlten oder, soweit visuell erfaßbar, schwächer ausgebildet waren; dies wurde auch unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Alters der Zellspender bestätigt. Das Ergebnis, das dem von Anderson et al. (1984, siehe oben) entspricht, steht im Gegensatz zu den 2D-Analysen von Müller et al. (1984), auf die unter 4.5. näher eingegangen wird.

Die untersuchte XYY-Zelllinie, die das H-Y Antigen nach den serologischen Tests (Wachtel et al., 1975b; Fraccaro et al., 1982; Moreira-Filho und Wachtel, 1985) stärker exprimieren sollte, zeigte in ihrem Proteinmuster keine gegenüber XY-Zellen stärker ausgeprägte Komponente. Auch wenn eine in diesem Fall höchstens zweifache Intensi-

tät eines vermutlich schwachen Spots visuell möglicherweise nicht erfaßbar war, so wäre doch die Anwesenheit eines gegenüber XO- und XX-Zelllinien zusätzlichen Proteins mit größerer Wahrscheinlichkeit als bei XY-Zellen aufgefallen.

4.4. KLONIERTE ZELLINIEN

Die 2D-Analyse von Klonen einer Parental-Zelllinie, die sich hinsichtlich eines bestimmten Merkmals oder Chromosoms aus mindestens zwei zu unterscheidenden Subpopulationen mit ansonsten identischem Genotyp zusammensetzt, erleichtert die Identifikation von spezifischen Spot-Varianten durch Ausschluß weiterer genetisch bedingter Einflüsse.

So konnten Weil und Epstein (1979) sowie die Arbeitsgruppe von Klose (1982) für einige Spot-Varianten eine erheblich größere Häufigkeit bei Trisomie 21-Klonen gegenüber normal diploiden Klonen ermitteln. Giometti et al. (1985) zeigten nach Klonierung einer Fibroblasten-Zelllinie, die zwei Tropomyosin-Varianten aufwies, daß sich die Proteinmuster ihrer Klone jeweils nur durch eine dieser Spot-Varianten auszeichneten.

Die Klonierung der drei Mosaik-Zelllinien ergab in allen Fällen mehr Klone mit normalem, als solche mit gonosomal aberranten Karyotyp; bei F86 (46,xy/45,xo) konnten keine XO-Klone mit brauchbarem Zellwachstum gezüchtet werden. Ein gonosomal aberranter Karyotyp, der die bekannten Störungen der Morphologie und Funktion des gesamten Organismus, wie zum Beispiel bei XO-Turner Patienten, zur Folge hat, könnte sich auch auf die Einzelzelle, zumindest in Hinsicht auf ihr Zellkultur-Wachstum, auswirken.

Der Vergleich der 2D-Muster klonierter Zelllinien derselben Parental-Zelllinie zeigte unabhängig vom Karyotyp einige größtenteils quantitative Differenzen. Auch Klose et al. (1982) stellten in den Proteinmustern klonierter Lungenfibroblasten eines Trisomie 21 Mosaiks Spot-Varianten fest, die unabhängig vom diploiden oder Chromosom 21-triploiden Karyotyp der Klone waren. Die 2D-Muster einzelner Fibroblasten-Klone wiesen untereinander stärkere Differenzen auf, als solche von Zelllinien aus einer Amnionzellklonierung. Auf Grund der unter 4.2. ausgeführten Anhaltspunkte ist nicht auszuschließen, daß es sich bei den aus einer Biopsie entstandenen Klonen um heterogene Subpopulationen hinsichtlich des Fibroblastentyps handelt.

Von jedem Zellklon wurde je eine Präparation des unfractionierten Zellmaterials und der tritonlöslichen Proteine autoradiographisch und durch Silberfärbung ausgewertet, die im Gegensatz zu den unklonierten Zelllinien nicht durch eine zweite Präparation überprüft wurden. Damit war gewährleistet, daß einzelne, nur bei bestimmtem oder optimalem Zellkultur-Zustand synthetisierten Proteine nicht als Artefakt der Präparation oder des Wachstums von der 2D-Analyse ausgeschlossen wurden.

So wurde bei der Suche nach Y-Chromosom-abhängigen Polypeptiden davon ausgegangen, daß solche zwar bei allen Klonen ohne Y-Chromosom fehlen mußten, möglicherweise aber nur von einigen Y-positiven Klonen synthetisiert wurden. Allerdings ergab sich selbst mit dieser Einschränkung kein Spot in den 2D-Mustern der Zelllinien aller untersuchten Klonierungen, der mit der Anwesenheit des Y-Chromosoms korreliert war.

Spots, deren Varianten im Rahmen einer Klonierung nicht völlig zufällig verteilt erschienen, wie Spot 11 und 12a/b bei F87 (46,xx/47,xy/48,xyy) und Spot 13 bei F85 (46,xy/45,xo) erwiesen sich entweder schon im Vergleich der zweiten Klonierung oder schließlich bei Untersuchung der unklonierten Zelllinien als nicht spezifisch für das Y-Chromosom.

Im übrigen konnte durch die Analyse der Klone das Ergebnis aus unklonierten Zelllinien bestätigt werden: XXY- und XO-Zelllinien zeichneten sich durch keine spezifischen Spot-Varianten aus; die individuelle Variante der Proteine p1a/b, p2, p3, p7, p8, p9 und p10 traten bei den Klonen in gleicher Weise wie in ihrer jeweiligen Parental-Zelllinie auf.

4-5. GESCHLECHTSSPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 2D-Proteinmuster beider Zellextrakte aus 30 unklonierten und 24 klonierten Fibroblasten-Zelllinien mit unterschiedlichem Gonosomen-Gehalt zeigten neben einem möglicherweise mit dem X-Chromosom korrelierten Polypeptid keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Aus über 400 Protein-Spots konnte keiner dem Y-Chromosom zugeordnet werden.

Ausgehend von der männlich spezifischen, als H-Y Antigen bezeichneten Struktur, sowie den unter 1.1. beschriebenen Transplantationsversuchen und Nachweisverfahren waren Fibroblasten das geeignete Zellmaterial für eine Suche nach Y-spezifischen Polypeptiden. In Hinsicht auf eine möglicherweise organspezifisch differenzierte Expression männlich spezifischer Strukturen lag für die klonierten Fibroblasten-Zelllinien von F87 (46,xx/47,xy/48,xxy), die aus Gonadengewebe stammten, die größte Wahrscheinlichkeit eines Unterschiedes vor.

Die Stichprobe enthielt Zelllinien aus Personen unterschiedlichen Alters, was jedoch für die Expression des H-Y Antigens offenbar nicht von Bedeutung ist. So ergab zum Beispiel der CML-Test von Goulmy (1983) eine H-Y positive Reaktion sowohl bei Zellen aus Nabelschnurblut von neugeborenen Jungen als auch bei Zellen von erwachsenen Männern.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß solche geschlechtsspezifischen Proteine in Zellkultur nicht synthetisiert werden, da die Fibroblasten hier ohne direkten Kontakt mit anderen Zelltypen und ohne Anschluß an das Hormonsystem wachsen. Transplantierte Haut von kastrierten männlichen Mäusen wurde in Versuchen verschiedener Arbeitsgruppen (z.B. Eichwald et al., 1958; Vojtíšková und Poláčková, 1966) akzeptiert oder später abgestoßen als solche von normalen männlichen Mäusen. Da kastrierte männliche Mäuse normale männliche Haut akzeptierten, (Vojtíšková und Poláčková, 1966) bedingt jedoch fehlender entsprechender Hormonhintergrund nicht die Fähigkeit, das H-Y Antigen als fremd zu erkennen.

Es ist möglich, daß das gesuchte Polypeptid in der mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfaßten Auswahl von ca. 600 abgebildeten beziehungsweise über 400 ausgewerteten Spots nicht enthalten ist, wenn man berücksichtigt, daß mittlerweile mit mehr als 10000 primären Genprodukten in einer Zelle gerechnet werden muß. Zu dieser Überlegung trägt auch die Tatsache bei, daß es sich bei dem H-Y Antigen um ein schwaches Antigen mit vermutlich geringer Dichte auf der Zelloberfläche handelt.

Allerdings gelang Jones (1977) neben der Identifikation von H-2K und H-2D auch der Nachweis der Ia Antigene in den 2D-Mustern der Zellextrakte von Maus-Lymphozyten. Die Problematik der visuellen Auswertung des Musters gegenüber einer computergesteuerten Analyse war in diesem Zusammenhang nicht von Relevanz, da nach einem zusätzlichen Protein-Spot und nicht nach geringen quantitativen Unterschieden gesucht wurde.

Zur Charakterisierung eines eventuell männlich spezifischen Spot-Unterschiedes wurde die Methode des Immunblottings mit H-Y Antiseren in Betracht gezogen. Der Vorversuch der Immunsorptionschromatographie zeigte schon im homologen Maussystem weder mit polyklonalen H-Y Antiseren aus dem eigenen Labor, noch mit dem monoklonalen H-Y Antiserum von Frau G. Koo ein für männliche Lymphozyten spezifisches Präzipitat. Die Kontrollversuche mit dem als schwaches Antigen bezeichneten I-A^k Antigen waren erfolgreich.

Da zudem im Verlauf der letzten Jahre verschiedentlich Anlaß zu einer differenzierteren und kritischeren Betrachtungsweise des serologisch definierten H-Y Antigens und seiner Testung gegeben war (Übersicht Crichton und Steel, 1985) wurden keine weiteren Versuche in dieser Richtung unternommen.

Es ist im Rahmen von 2D-elektrophoretischen Untersuchungen nur eine Arbeit bekannt, in der als Y-chromosomal codierte Proteine zwei Spots (6,3/38 kD, 5,4/30 kD) bezeichnet werden (Müller et al., 1984, siehe auch 1.2.). Die Spots ergaben sich als Differenzen der mit Silber gefärbten 2D-Muster einer XY- und einer XO-Zelllinie aus Fibroblasten eines monozygoten Zwillingspaares mit mitotischer Nondisjunktion der Gonosomen vor der Trennung des Keimes in zwei Hälften. In dieser Publikation wird erwähnt, daß die beiden Spots auch bei weiteren XO-, XX- und XXX-Zelllinien aus anderen Individuen fehlten; allerdings sind keine Angaben über das gleiche Auftreten der Spots bei weiteren Y-positiven Zelllinien gemacht. Auch ist der Publikation nicht zu entnehmen, ob dieses Ergebnis durch mehrere Präparationen derselben Y-positiven Zelllinie bestätigt wurde.

In den vorliegenden Untersuchungen besteht für die XY- und XO-Klone der Mosaik-Zelllinie F85 (46,xy/45,xo) eine vergleichbare Situation: bei genetisch identischem Hintergrund unterscheiden sie sich durch An- und Abwesenheit des Y-Chromosoms. Der Vergleich ihrer Proteinmuster ergab ebenso wie der unklonierter XY- gegenüber XO-Zelllinien auch im Bereich der von Müller et al. angegebenen pl- und MG-Werte keine spezifischen Spot-Varianten. Der Spot 12a/b (bei 5,4/24 kD) aus dem Vergleich der Klone von F87 (46,xx/47,xxy/48,xxyy) erwies sich bei Vergleich mit den Klonen von F85 und den unklonierten Zelllinien als unspezifisch.

Der derzeitige Stand der Kenntnisse von der biochemischen Natur des H-Y Antigens (siehe 1.1.4.) läßt die Möglichkeit offen, daß ein Y-spezifischer Unterschied mit diesen Protein-analytischen Methoden nicht faßbar ist.

So ist nicht auszuschließen, daß das H-Y Antigen eine Struktur aus der Gruppe der Glykolipide darstellt, die mit der 2D-Gelelektrophorese nicht abgebildet werden.

Möglicherweise handelt es sich bei dem Y-spezifischen Unterschied um geringfügige Konfigurationsänderungen oder minimale Differenzen bezüglich der Kohlehydratseitenketten einer im übrigen für Y-positive und Y-negative Zellen identischen antigenen Zelloberflächen-Struktur. Denkbar wäre hierbei eine Y-abhängige spezifische Glykosyltransferase: Shapiro und Erickson (1981) halten einen terminalen Galaktosylrest verantwortlich für die H-Y Spezifität. Das Modell von Adinolfi et al., (1982) sieht eine H-Yp Precursor-Substanz vor, die unter Einfluß des Y-Chromosoms zum spezifischen H-Ya Antigen, unter Einfluß des X-Chromosoms jedoch zur unspezifischen H-Yr Substanz wird. Hieraus ergäbe sich auch eine Erklärung für die schwache Affinität und den niedrigen Serum-Titer des H-Y Antikörpers.

Schließlich könnte die Y-Spezifität durch unterschiedliche Position verschiedener Strukturen der Zelloberfläche zueinander entstehen. Anhaltspunkte hierfür bieten die Rolle des HLA-B₂-Mikroglobulin Dimers bei der Fixierung des H-Y Antigens an der Zelloberfläche (siehe 1.1.4.) sowie die in einzelnen CML-Tests bewiesene H-2 bzw. HLA-Restriktion der H-Y Spezifität (siehe 1.1.1.).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellulären Proteine kultivierter, menschlicher Fibroblasten mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert und insbesondere auf mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede ihrer Zusammensetzung untersucht.

Die Stichprobe umfaßte 33 unklonierte Zelllinien von 31 Individuen, die normale weibliche und männliche sowie gonosomal aberrante Karyotypen aufwiesen. Enthalten waren drei Zelllinien, die Mosaik aus Subpopulationen mit normalem und gonosomal aberrantem Karyotyp darstellten und zur Klonierung verwendet wurden. Die Fibroblasten stammten mit Ausnahme von zwei Lungen-, einer Skrotum- und einer Gonaden-Zelllinie aus Biopsien vom Oberarm und Oberschenkel.

Aus unmarkierten sowie in Kultur radioaktiv markierten Fibroblasten jeder Zelllinie wurden Präparationen des unfraktionierten Zellmaterials und der tritonlöslichen Proteinfraction erstellt. Die Darstellung ihrer 2D-Proteinmuster erfolgte durch Silberfärbung und Autoradiographie.

Die vergleichende Analyse beider Präparationen aller Zelllinien ergab einige quantitative und wenige qualitative Variationen in den 2D-Mustern. Als Zelllinien-spezifisch erwies sich die unterschiedliche Abbildung der Proteine p1a (5,8/45 kD), p1b (5,81/45 kD), p2 (5,6/27 kD), p3 (5,9/63 kD), p4 (6,05/29 kD), p5 (6,05/28 kD), p6 (5,3/22 kD), p7 (5,25/20 kD), p8 (6,2/37 kD) aus totalem Zellprotein sowie die der Proteine p2 (5,6/27 kD), p9 (6,2/39 kD), p10 (6,1/39 kD) aus der tritonlöslichen Zellfraktion. Unter Ausschluß von gewebs- und subpopulationsspezifischen Variationen kommen zwei qualitative Varianten (p1a/b, p2), drei quantitative Varianten (p3, p7, p8) und die korrelierte quantitative und qualitative Variation der Proteine p9 und p10 als individuelle Unterschiede mit genetischem Hintergrund in Betracht.

Haut- und Lungenfibroblasten unterschieden sich durch die Expression der Proteine p4 und p5 sowie durch einige quantitative Varianten. Die Gegenüberstellung von Fibroblasten aus Haut und Skrotum ergab keine spezifischen Variationen der Proteinmuster.

X-chromosomal codierte Proteine stellten p7 und möglicherweise p8 dar. Das Polypeptid p7 war bei einer XXXXY-Zelllinie und zwei Poly-X-Zelllinien bei unfraktioniertem Zellmaterial und tritonlöslicher Fraktion gegenüber allen Zelllinien mit einem

oder zwei X-Chromosomen stärker konzentriert; der nur teilweise vorhandene Spot von p8 war bei den Poly-X-Zelllinien am stärksten abgebildet.

In den 2D-Mustern gonosomal aberranter Zelllinien mit den Karyotypen 45,xo, 47,xyy, 47,yyy, 47,xxx, 48,xxxx und 49,xxxxy wurden keine weiteren Proteinvarianten als spezifisch für einen der aberranten Karyotypen festgestellt.

Die Proteinmuster unklonierter Fibroblasten (zehn XY-Zelllinien, sieben XX-Zelllinien, sechs XO-Zelllinien, sieben weitere gonosomal aberrante Zelllinien) zeigten keine qualitativen oder quantitativen Variationen, die in Zusammenhang mit der An- und Abwesenheit des Y-Chromosoms standen.

Zur Suche nach Y-chromosomal codierten Proteinen bei Fibroblasten mit identischem genetischem Hintergrund wurden Klonierungen der drei Mosaik-Zelllinien F85 (46,xy/45,xo), F86 (46,xy/45,xo) und F87 (46,xx/47,xyy/48,xyy) durchgeführt. Aus den entstandenen Klonen wurden bei F85 acht Y-positive und fünf Y-negative, bei F86 vier Y-positive sowie bei F87 drei Y-positive und vier Y-negative Zelllinien zur 2D-Analyse herangezogen.

Der Vergleich der Proteinmuster von Y-positiven und Y-negativen Zellklonen aus den drei Mosaik-Zelllinien ergab wenige, Zellkultur- und Subpopulations-spezifische Variationen der Spots. Auch hier wurde kein Protein identifiziert, das in Korrelation mit dem Y-Chromosom exprimiert wurde.

Mit Vorversuchen im homologen Maussystem wurde die Möglichkeit getestet, durch Immunpräzipitation mit polyklonalen und monoklonalen sogenannten H-Y Antiseren männlich spezifische Strukturen anzureichern.

Trotz erfolgreicher Kontrolle des angewendeten Verfahrens bei Anreicherung des schwachen I-A^k Antigens mit einem monoklonalen I-A^k Antiserum wurden mit sogenannten H-Y Antiseren keine Proteine aus männlichen Maus-Lymphozyten spezifisch präzipitiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adinolfi M, Polani P, Zenthon J: Genetic control of H-Y synthesis: A hypothesis.
Hum Genet 61: 1-2, 1982
- Anderson NL, Giometti CS, Gemmell MA, Macy M: Protein Variants in human cells: Enumeration by protein indexing.
Ann N Y Acad Sci 428: 134-143, 1984
- Anderson NL: Induction of a mitochondrial matrix protein in human fibroblasts by interferon or poly I:C.
Electrophoresis 6: 277-282, 1985
- Ansorge W: Fast visualisation of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate.
In: Proceedings of the third international conference on electrophoresis. D.Stathakos (ed), Dr Gruyter & Co, Berlin - New York 1983, pp 235-242
- Bailey DW, Hoste J: A gene governing the female immune response to the male antigen in mice.
Transplantation 11: 404-407, 1971
- Bailey DW: Allelic forms of a gene controlling the female immune response to the male antigen in mice.
Transplantation 11: 426-428, 1971
- Barrett T, Gould HJ: Tissue and species specificity of non-histone chromatin proteins.
Biochim Biophys Acta 294: 165-170, 1973
- Bennett D, Mathieson BJ, Scheid M, Yanagisawa K, Boyse EA, Wachtel SS, Cattach BM: Serological evidence for H-Y antigen in Sxr, XX sexreversed phenotypic males.
Nature 265: 255-257, 1977
- Beverstock GC: The current state of research with peripheral tissues in Huntington disease.
Hum Genet 66: 115-131, 1984
- Bhakdi S, Knüfermann H, Hoelz/Wallach DF: Separation of EDTA-extractable erythrocyte membrane proteins by isoelectric focussing linked to electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.
Biochim Biophys Acta 345: 448-457, 1974
- Billingham RE, Silvers WK: Inbred animals and tissue transplantation immunity.
Transplant Bull 2: 399-406, 1959
- Billingham RE, Silvers WK: Studies of tolerance of the Y chromosome antigen in mice.
J Immunol 85: 14-26, 1960

- Bonner WM, Laskey RA: A film detection method for tritium labeled proteins and nucleic acid in polyacrylamide gels.
Eur J Biochem 26: 83-88, 1974
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem 72: 248-254, 1976
- Bradley MP, Heslop BF: A biochemical and immunological approach to the identification of H-Y antigenic proteins secreted from Daudi cells.
Hum Genet 71: 117-121, 1985
- Bravo R, Small JV, Fey SJ, Larsen PM, Celis JE: Architecture and polypeptide composition of HeLa cytoskeletons.
J Mol Biol 154: 121-143, 1982
- Bravo R, Celis JE: Catalog of HeLa cell proteins.
In: Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. J.E.Celis, R.Bravo (eds), Academic Press Inc, 1984, pp 445-476
- Burghes AHM, Dunn MJ, Statham HE, Dubowitz V: Analysis of skin fibroblast proteins in Duchenne muscular dystrophy: 2.Isoelectric focusing under dissociating conditions.
Electrophoresis 3; 185-196, 1982
- Burgoyne PS, Levy ER, Mc Laren A: Spermatogenic failure in male mice lacking H-Y antigen.
Nature 320: 170-172, 1986
- Casanova-Bettane M, Fellous M: Antigène H-Y et dysgénésies sexuelles chez l'homme.
CR Soc Biol (Paris) 175: 8-18, 1981
- Caspersson T, Zech L: Fluorescent labeling and identification of human chromosomes. In: Perspectives in cytogenetics. S.W.Wright, B.F.Cromdall, L.Boyer (eds), Thomas, Springfield Illinois, 1972, pp 165-185
- Celada F, Welshons WJ: An immunogenetic analysis of the male antigen in mice utilizing animals with an exceptional chromosome constitution.
Genetics 48: 139-151, 1963
- Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ, Bellatin J, Celis A: Expression of cellular proteins in normal and transformed human cultured cells and tumors: Two-dimensional gel electrophoresis as a tool to study neoplastic transformation and cancer.
In: Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. J.E.Celis, R.Bravo (eds), Academic Press Inc, 1984, pp 307-362
- Chandra HS: Sex determination: A hypothesis based on noncoding DNA.
Proc Natl Acad Sci (USA) 82: 1165-1169, 1985
- Comings DE, Cohen LW: Two-dimensional gel electrophoresis of ^{125}I -labeled surface proteins of human fibroblasts.
Biochim Biophys Acta 578: 861-867, 1979

Cox RD, Francke U, Epstein CJ: Assignment of genes to the human X chromosome by two-dimensional electrophoretic analysis of total cell proteins from rodent-human somatic cell hybrids.

Am J Hum Genet 33: 495-512, 1981

Crichton DN, Steel CM: Serologically detectable H-Y ('male') antigen: Mr or Myth?

Immunology Today 6: 202-203, 1985

DeMott-Friberg R, Beals TF, Schultz JS: H-2 and background influences on tissue grafts across the H-Y barrier.

Immunogenetics 9: 369-381, 1979

Drapacoli NC, Rettig WJ, Albine AP, Esposito D, Archidiacono N, Rocchi M, Siniscalco M, Old LJ: Genes controlling gp25/30 cell surface molecules map to chromosomes X and Y and escape X-inactivation.

Am J Hum Genet 37: 199-207, 1985

Dunn MJ, Burghes AHM: High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. II. Analysis and applications.

Electrophoresis 4: 173-189, 1983

Eichwald EJ, Silmser CR: Untitled communication.

Transplant Bull 2: 148-149, 1955

Eichwald EJ, Silmser CR, Weissmann I: Sex-linked rejection of normal and neoplastic tissue. I. Distribution and specificity.

J Natl Cancer Inst 20: 563-575, 1958

Engel W, Klemme B, Ebrecht A: Serologically evidence for H-Y antigen in XO female mice.

Hum Genet 57: 68-70, 1981a

Engel W, Klemme B, Schmid M: H-Y antigen and sex determination in turtles.

Differentiation 20: 152-156, 1981b

Fellous M, Gunther E, Kemler R, Wiels J, Berger R, Guenet JL, Jakob H, Jacob F: Association of the H-Y male antigen with B₂-microglobulin on human lymphoid and differentiated mouse teratocarcinoma cell lines.

J Exper Med 147: 58-70, 1978

Fey SJ, Bravo R, Larsen PM, Celis JE: Correlation between mouse and human two-dimensional gel patterns: Peptide mapping of proteins extracted from two-dimensional gels.

In: Two-dimensional gel electrophoresis of proteins.

J.E.Celis, R.Bravo (eds), Academic Press Inc, 1984, pp 170-187

Fierz W, Brenan M, Müllbacher A, Simpson E: Non-H-2 and H-2 linked immune response genes control the cytotoxic T-cell response to H-Y.

Immunogenetics 15: 261-270, 1982

Fracaro M, Mayerová A, Wolf U, Bühler E, Gebauer J, Gilgenkranth S, Lindsten J, Lo Curto F, Rithén EM: Correlation between the number of sex chromosomes and the H-Y antigen titer.

Hum Genet 61: 135-140, 1982

- Galbraith GMP, Galbraith RM, Faulk WP, Wachtel SS: Detection of H-Y antigen by fluorescence microscopy.
Transplantation 26: 25-27, 1978
- Garrels JJ: Two dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines.
J Biol Chem 16: 7961-7977, 1979
- Gasser DL, Silvers WK: The genetic basis of male skin rejection in mice.
Transplantation 12: 412-414, 1971
- Gasser DL, Silvers WK: Genetics and immunology of sex-linked antigens.
Adv Immunol 15: 215-247, 1972
- Giometti CS, Anderson NL: A variant of human nonmuscle tropomyosin found in fibroblasts by using two-dimensional electrophoresis.
J Biol Chem 256: 11840-11846, 1981
- Giometti CS, Willard KE, Anderson NL: Cytoskeletal proteins from human skin fibroblasts, peripheral blood leukocytes, and a lymphoblastoid cell line compared by two-dimensional gelelectrophoresis.
Clin Chem 28: 955-961, 1982
- Giometti CS, Anderson NL: An electrophoretic variant of a human fibroblast protein with characteristics of smooth muscle tropomyosin.
J Mol Biol 173: 109-123, 1984
- Giometti CS, Gemmell MA, Anderson NL: Two different variants of the same tropomyosin polypeptide in clones from GM1368 human skin fibroblasts.
Biochim Biophys Res Comm 128: 1247-1253, 1985
- Goding JW: Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent.
J Immunol Meth 20: 241-253, 1978
- Goldberg EH, Boyse EA, Bennett D, Scheid M, Carswell EA: Serological demonstration of H-Y (male) antigen of mouse sperm.
Nature 232: 478-480, 1971
- Goldberg EH, Boyse EA, Scheid M, Bennett D: Production of H-Y antibody by female mice that fail to reject male skin.
Nature New Biol 238: 55-57, 1972
- Goldberg EG, Shen F, Tokuda S: Detection of H-Y (male) antigen on mouse lymph node cells by the cell to cell cytotoxicity test.
Transplantation 15: 334-336, 1973
- Goldberg EH, Arrington T, Tokuda S: Detection of H-Y antigen on human male leukocytes.
J Immunol Meth 23: 203-206, 1978
- Goldman D, Merril CR: Human lymphocyte polymorphism detected by quantitative two-dimensional electrophoresis.
Am J Hum Genet 35: 827-837, 1983

Goodfellow PN, Tippett P: A human quantitative polymorphism related to Xg blood groups.

Nature 289: 404-405, 1981

Goodfellow P: Expression of the 12 E7 antigen ist controlled independently by genes on the human X and Y chromosomes.

Differentiation 23 (Suppl): 35-39, 1983

Gordon EG, Simpson E, Samelson LE: In vitro cell-mediated immune responses to the male specific (H-Y) antigen in mice.

J Exper Med 142: 1108-1120, 1975

Gordon RD, Mathieson BJ, Samelson LE, Boyse EA, Simpson E: The effect of allogeneic presensitization on H-Y graft survival and in vitro cell-mediated responses to H-Y antigen.

J Exper Med 144: 810-820, 1976

Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ: Alloimmunity to human H-Y. Lancet 2: 1206, 1976

Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van RoodJJ: Y-antigen killing by T-cells of women ist restricted to HLA.

Nature 266: 544-545, 1977

Goulmy E, Bradley BA, Lansbergen Q, van Rood JJ: The importance of H-Y incompatibility in human organ transplantation.

Transplantation 25: 315-319, 1978

Goulmy E, van Leeuwen A, Blokland E, Sachs ES, Geraedts JPM: The recognition of abnormal sex chromosome constitution by HLA restricted anti-H-Y cytotoxic T cells and antibody.

Immunogenetics 17: 523-531, 1983

Hall JL, Wachtel SS: Primary sex determination: Genetics and biochemistry.

Molec Cell Biochem 33: 49-66, 1980

Hall JL, Bushkin Y, Wachtel SS: Immunoprecipitation of H-Y antigen.

Hum Genet 58: 34-36, 1981

Hamaguchi H, Ohta A, Mukai R, Toshio Y, Yamada M: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 1. Detection of genetic variant polypeptides in PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes.

Hum Genet 59: 215-220, 1981

Harper RA, Grove G: Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: Differences in growth potential in vitro.

Science 204: 526-527, 1979

Harris H, Hopkins DA, Edwards YM: Polymorphism and the subunit structure of enzymes: A contribution to the neutralist-selectionist controversy.

Proc Natl Acad Sci (USA) 74: 698-701, 1977

Haseltine FP, DePonte KK, Breg WR, Genel M: Presence of H-Y antigen in patients with Ullrich-Turner syndrome and X chromosome rearrangements.

Am J Med Genet 11: 97-107, 1982

Hauschka TS: Probable Y-linkage of a histocompatibility gene (discussion of Eichwald and Silmser's skin-graft data).
Transplant Bull 2: 155-157, 1955

Hauschka TS, Grinnell ST, Meagher M, Amos DB: Sex-linked incompatibility of male skin and primary tumors transplanted to isologous female mice.
In: Genetics and Cancer. Austin, University of Texas Press, 1959, pp 271-294

Hendricks M, Weintraub H, Tropomyosin is decreased in transformed cells.
Proc Natl Acad Sci (USA) 78: 5633-5637, 1981

Hightower MJ, Fairfield FR, Lucas JJ: A staining procedure for identifying viable cell hybrids constructed by somatic cell fusion, cybridization, or nuclear transplantation.
Som Cell Genet 7: 321-329, 1981

Hope RM, Goodfellow PN, Solomon E, Bodmer WF: Identification of MIC₅, a human X-linked gene controlling expression of a cell surface antigen: definition by a monoclonal antibody raised against a human x mouse somatic cell hybrid.
Cytogenet Cell Genet 33: 204-212, 1982

Hurme M, Hetherington CM, Chandler PR, Simpson E: Cytotoxic T-cell responses to H-Y: Correlation with the rejection of syngenic male skin grafts.
J Exper Med 147: 768-775, 1978

Ivarie RD, O'Farrell PH: The glucocorticoid domain: Steroid mediated changes in the rate of synthesis of rat hepatoma proteins.
Cell 13: 41-55, 1978

Johnson LL: Genetic influences other than H-2 on the rejection of male skin grafts by female mice.
Immunogenetics 8: 373-375, 1979

Jones PP: Analysis of H-2 and Ia molecules by two-dimensional gel electrophoresis.
J Exp Med 146: 1261-1279, 1977

Juretić A, Malenica B, Juretić E, Klein J, Nagy ZA: Helper effects required during in vivo priming for a cytolytic response to the H-Y antigen in nonresponder mice.
J Immunol 134: 1408-1414, 1985

Kaltschmidt E, Wittmann HG: Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins.
Anal Biochem 36: 401-412, 1970

Kenrick KG, Margolis J: Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: A two-dimensional technique.
Anal Biochem 33: 204-207, 1970

Klose J: Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissue.
Humangenetik 26: 231-243, 1975

Klose J, Nowak J, Kade W: Two-dimensional electrophoresis: High resolution of proteins and automatic evaluation of the patterns under different methodical conditions.

In: Electrophoresis '79. B.J.Radola (ed), De Gruyter & Co, Berlin-New York, 1980. pp 297-312

Klose J, Zeindl E, Sperling K: Analysis of protein patterns in two-dimensional gels of cultured human cells with trisomy 21.

Clin Chem 28: 987-992, 1982

Klose J: High resolution of complex protein solutions by two-dimensional electrophoresis.

In: Modern methods in protein chemistry - review articles. H.Tschesche (ed), De Gruyter & Co, Berlin-New York, 1983, pp 49-78

Klose J, Willers I, Singh S, Goedde HW: Two-dimensional electrophoresis of soluble and structure-bound proteins from cultured human fibroblasts and hair root cells: Qualitative und quantitative variation.

Hum Genet 63: 262-267, 1983

Klose J: Anwendung der zwei-dimensionalen Elektrophorese in der Genetik.

In: Elektrophorese Forum '85. B.J.Radola (ed), TU München, 1985, pp 71-86

Kondo J, Yamamoto T, Yamakawa K, Harada S, Oishi H, Nishigaki J, Hamaguchi H: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis.

Hum Genet 66: 248-251, 1984

Koo GC, Wachtel SS, Krupen-Brown K, Mittl LR, Breg WR, Genel M, Rosenthal JN, Borgaonkar DS, Miller DA, Tantravahi R, Schreck RR, Erlanger BF, Miller OJ: Mapping the locus of the H-Y gene of the human Y chromosome.

Science 198: 940-942, 1977

Koo GC: Serology of H-Y antigen.

Hum Genet 58: 18-20, 1981

Koo GC, Tada N, Chaganti R, Hämmerling U: Application of monoclonal anti-H-Y antibody for human H-Y typing.

Hum Genet 57: 64-67, 1981

Koo GC, Reidy JA, Nagamine CM: H-Y antigen in mice.

Immunogenetics 18: 37-44, 1983

Králová J, Lengerová A: H-Y antigen: Genetic control of the expression as detected by host-versus-graft popliteal lymph node enlargement assay maps between the T and H-2 complexes.

J Immunogenet 6: 429-438, 1979

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄.

Nature 227: 680-685, 1970

Leavitt J, Kakunaga T: Expression of a variant form of actin and additional polypeptide changes following chemical-induced in vitro neoplastic transformation of human fibroblasts.

J Biol Chem 255: 1650-1669, 1980

- Leavitt J, Goldman D, Merrill C, Kakunaga T: Actin mutations in a human fibroblast model for carcinogenesis.
Clin Chem 28: 850-860, 1982
- Lehto V-P, Virtanen J: Intermediate filaments anchor the nuclei in nuclear monolayers of cultured human fibroblasts.
Nature 272: 175-177, 1978
- Macko V, Stegemann H: Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis. Identification of varieties.
Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 350: 917-919, 1969
- Macieira-Coelho A: Cell cycle analysis.
In: Tissue culture methods and applications. P.F.Kruse Jr., M.K.Patterson Jr. (eds), Academic Press Inc, 1973, pp 412-422
- Mariani T, Martinez C, Smith JM, Good RA: Age factor and induction of immunological tolerance to male skin isografts in female mice subsequent to the neonatal period.
Ann N Y Acad Sci 87: 93-105, 1960
- McConkey EH, Taylor BJ, Phan D: Human heterozygosity: A new estimate.
Proc Natl Acad Sci (USA) 76: 6500-6504, 1979
- McConkey EH: Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins.
Proc Natl Acad Sci (USA) 79: 3236-3240, 1982
- Mc Laren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P, Hogg H: Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen.
Nature 312: 552-555, 1984
- Melvold, RE, Kohn HJ, Yerganian G, Fawcett DW: Evidence suggesting the existence of two H-Y antigens in the mouse.
Immunogenetics 5: 33-41, 1977
- Merrill CR, Goldman D: Detection of polypeptides in two-dimensional gels using silver staining.
In: Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. J.E.Celis, R.Bravo (eds), Academic Press Inc, 1984, pp 93-108
- Moll R, Franke WW, Schiller DL: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell 31: 11-24, 1982
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WC, Battips DM, Hungerford DA: Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood.
Exp Cell Res 20: 613-616, 1960
- Moscona A: Rotation-mediated histogenic aggregation of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interactions in vitro.
Exper Cell Res 22: 455-475, 1961

- Moreira-Filho CA, Wachtel SS: Study of H-Y antigen in abnormal sex determination with monoclonal antibody and an ELISA.
Am J Med Genet 20: 525-534, 1985
- Müller U, Aschomeit I, Zenzes MT, Wolf U: Binding studies of H-Y antigen in rat tissue: Indications for a gonad specific receptor.
Hum Genet 43: 151-157, 1978
- Müller U, Bross K: A highly sensitive peroxidase-antiperoxidase method for detection of H-Y antigen on cultivated human fibroblasts.
Hum Genet 52: 143-147, 1979
- Müller U, Maier N, Gimelli G, Fraccaro M: Y-dependent polypeptides identified by two dimensional gel electrophoresis of monozygotic XO and XY fibroblasts.
Hum Genet 67: 108-110, 1984
- Müller U, Voiculescu I: On the development of a standard two-dimensional polypeptide map of the human X chromosome.
Hum Genet 67: 400-405, 1984
- Nagai Y, Ciccarese S, Ohno S: The identification of human H-Y antigen and testicular transformation induced by its interaction with the receptor site of bovine fetal ovarian cells.
Differentiation 13: 155-164, 1979
- O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J Biol Chem 250: 4007-4021, 1975
- Ohno S: Major regulatory genes for mammalian sexual development.
Cell 7: 315-321, 1976
- Ohno S: The original function of MHC antigens as the general plasma membrane anchorage site of organogenesis-directing proteins.
Immunol Rev 33: 59-69, 1977
- Ohno S, Nagai Y, Ciccarese S: Testicular cells lysostripped of H-Y antigen organize ovarian follicle-like aggregates.
Cytogenet Cell Genet 20: 351-364, 1978
- Polani RE, Adinolfi M: The H-Y antigen and its functions: A review and a hypothesis.
J Immunogenetics 10: 85-102, 1983
- Race RR, Sanger R
In: Blood groups in man. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975
- Sachs L, Heller E: The sex-linked histocompatibility antigens.
J Natl Cancer Inst 20: 555-561, 1958
- Sammons DW, Adams LD, Nishizawa EE: Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 2: 135-141, 1981
- Scheid M, Boyse EA, Carswell EA, Old LJ: Serologically demonstrable alloantigens of mouse epidermal cells.
J Exper Med 135: 938-955, 1972

- Schneider EL, Mitsui Y, An KS, Shorr SS: Tissue-specific differences in cultured human diploid fibroblasts.
Exp Cell Res 108: 1-6, 1977
- Seabright U: A rapid banding technique for human chromosomes.
Lancet II: 971-972, 1971
- Shapiro M, Erickson RP: Evidence that the serological determinant of H-Y antigen is carbohydrate.
Nature 290: 503-505, 1981
- Silvers WK, Billingham RE: Genetic background and expressivity of histocompatibility genes.
Science 158: 118-119, 1967
- Silvers WK, Murphy G, Poole TW: Studies on the H-Y antigen in rats.
Immunogenetics 4: 85-100, 1977
- Silvers WK, Gasser DL, Eicher EM: H-Y antigen, serologically detectable male antigen and sex determination.
Cell 28: 439-440, 1982
- Singh S, Willers J, Klose J, Goedde HW: High-resolution protein mapping of human fibroblasts and hair root cells: A standardized reproducible procedure considering the effect of cell culture parameters.
Biochem Genet 19: 871-880, 1981
- Simpson E, Gordon RD: Responsiveness to H-Y antigen: Ir gene complementation and target cell specificity.
Immunol Rev 35: 59-75, 1977
- Simpson E, Brunner C, Hetherington C, Chandler P, Brenan M, Dagg M, Bailey DW: H-Y antigen: No evidence for alleles in wild strains of mice.
Immunogenetics 8: 213-219, 1979
- Simpson E, Edwards P, Wachtel S, Mc Laren A, Chandler P: H-Y antigen in Sxr mice detected by H-2 restricted cytotoxic T cells.
Immunogenetics 13: 355-358, 1981
- Simpson E: The role of H-Y as a minor transplantation antigen.
Immunology Today 3: 97-106, 1982
- Simpson E, Mc Laren A, Chandler P: Evidence for two male antigens in mice.
Immunogenetics 15: 609-614, 1982
- Simpson E: The H-Y antigen and sex reversal.
Cell 44: 813-814, 1986
- Snell GD: The genetics of transplantation.
J Natl Cancer Inst 14: 691-704, 1953
- Stimpfling JH, Reichert AE: Male-specific graft rejection and the H-2 locus.
Transplantation 12: 527-531, 1971

Taggart RD, Francke U: Mapping of polypeptide genes by two-dimensional gel electrophoresis of hybrid cell extracts.
Cytogenet Cell Genet 32: 99-110, 1982

Talbot K, MacLeod AR: Novel form of non-muscle tropomyosin in human fibroblasts.
J Mol Biol 164: 159-174, 1983

Tasheva B, Dessev G: Artifacts in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis due to 2-Mercaptoethanol.
Anal Biochem 129: 98-102, 1983

Unteregger G: The nuclear proteins in the human fibrosarcoma cell line 1080: Synthesis and phosphorylation.
In: Electrophoresis '84. V. Neuhoff (ed), De Gruyter & Co., Berlin-New York, 1984, pp 495-498

van Leeuwen A, Goulmy E, van Rood JJ: Major histocompatibility complex-restricted antibody mainly, but not exclusively directed against cells from male donors.
J Exper Med 150: 1075-1083, 1979

Vojtísková M, Polácková M: An experimental model of the epigenetic mechanism of autotolerance using the H-Y antigen in mice.
Folia Biol (Praha) 12: 137-140, 1966

v.Boehmer H, Hengartner H, Nabholz M, Lernhardt W, Schreier MH, Haas W: Fine specificity of an continuously growing killer cell clone specific for H-Y antigen.
Eur J Immunol 9: 592-597 (1979)

Wachtel SS, Gasser DL, Silvers WK: Male specific antigen: Modification of potency by the H-2 locus in mice.
Science 181: 862-863, 1973

Wachtel SS, Koo GC, Zuckerman EE, Hämmerling U, Scheid M, Boyse EA: Serological crossreactivity between H-Y (male) antigen of mouse and man.
Proc Natl Acad Sci (USA) 71: 1215-1218, 1974

Wachtel SS, Ohno S, Koo GC, Boyse EA: Possible role of H-Y antigen in primary determination of sex.
Nature 257: 235-236, 1975a

Wachtel SS, Koo GC, Breg WR, Elias S, Boyse EA, Miller OJ: Expression of H-Y antigen in human males with two Y chromosomes.
New Engl J Med 293: 1071-1072, 1975b

Wachtel SS, Koo GC, Breg WR, Genel M: H-Y antigen in X,i(Xq) gonadal dysgenesis: Evidence of X-linked genes in testicular differentiation.
Hum Genet 56: 183-187, 1980

Wachtel SS
In: H-Y antigen and the biology of sex determination. S.S.Wachtel (ed), Grune & Stratton, New York, London, 1983

Walton KE, Styer D, Gruenstein EI: Genetic polymorphism in normal human fibroblasts as analysed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
J Biol Chem 254: 7951-7960, 1979

- Weber K, Osborn M: Die Moleküle des Zellskeletts.
Spektrum der Wissenschaften 12: 102-114, 1985
- Weil J, Epstein CJ: The effect of trisomy 21 on the patterns of polypeptide synthesis in human fibroblasts.
Am J Genet 31: 478-488, 1979
- Wiberg UH: H-Y transplantation antigen in human XO females.
Hum Genet 69: 15-18, 1985
- Willers J, Singh S, Goedde HW, Klose J: High resolution protein mapping in fibroblast cell lines and hair roots from patients with genetic disease.
Clin Genet 20: 217-221, 1981
- Wilson JD, The endocrine control of sexual differentiation.
The Harvey Lect Ser 79: 145-171, 1985
- Wolf U, Fraccaro M, Mayerová A, Hecht T, Maraschio P, Hameister H: A gene controlling H-Y antigen on the X chromosome.
Hum Genet 54: 149-154, 1980a
- Wolf U, Fraccaro M, Mayerová A, Hecht T, Zuffardi O, Haumeister H: Turner syndrome patients are H-Y positiv.
Hum Genet 54: 315-318, 1980b
- Zecher R, Reske K: Isolation of I-A^k core complex and its associated gamma-polypeptide by affinity-chromatography on monoclonal immuno-adsorbent 10-2.16 Sepharose CL-4B.
Mol Immunol 19: 1037-1044, 1982
- Zeiss IM, Nisbet NW, Heslop BF: A male antigen in rats.
Transplant Bull 30: 161-163, 1962
- Zenzes MT, Reed TE: Variability in serologically detected male antigen titer and some resulting problems: A critical review.
Hum Genet 66: 103-109, 1984

ABKÜRZUNGEN

CD	cytotoxically defined (H-Y Antigen)
Ci	Curie
CML	cell-mediated lympholysis
cpm	counts per minute
DNS	Desoxyribonukleinsäure
HeLa	etablierte Zelllinien aus Zervikalkarzinom
^3H	Tritium
HLA	human lymphocyte system A
kD	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
Mr	Molekularer Radius
NP40	Nonidet P40
pI	isoelektrischer Punkt
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
SDM	serologically detectable male (H-Y Antigen)
SDS	Natriumdodecylsulfat

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. H. Cleve, der die Anregung zu der vorliegenden Arbeit gab, für die Möglichkeit, diese in seinem Labor durchzuführen sowie für die zahlreichen Gespräche im Rahmen seiner verständnisvollen Betreuung,

Frau Prof. Dr. M. Hirsch-Kaufmann, Frau Dr. A. Wirtz, Herrn Prof. Dr. H. Höhn, Herrn Dr. K. Miller und Herrn Dr. med. habil. K.G. Wurster, die freundlicherweise die Fibroblasten-Zelllinien zur Verfügung stellten,

Frau Dr. G. Koo und Herrn Dr. K. Reske für die Überlassung der monoklonalen H-Y bzw. I-A^k Antisera,

Herrn Dr. J. Wienberg und Frl. U. Maurer, die sich mit der Durchführung der Karyotypisierung befaßten,

Herrn Dr. Jungfer für die bereitwillige Unterstützung bei der Klonierung der Mosaik-Zelllinien,

allen Mitarbeitern für die Zusammenarbeit im Labor, insbesondere Frl. P. Fegert für ihre Assistenz zu Beginn der Arbeit, und Frl. A. Brandhofer für die Mitarbeit in der Gewebekultur,

Herrn Ruck für die Hilfe bei der photographischen Darstellung der Ergebnisse, sowie Herrn P. Münzer und Frau B. Schlee, mit deren Unterstützung die Arbeit die vorliegende Form bekam,

nicht zuletzt meinem Mann für sein Verständnis und die Geduld, die er im Lauf der Jahre aufbringen mußte.

Die Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Cl 27/11-1-3).

LEBENS LAUF

Sabine Klösser-Ziegmayer geb. Ziegmayer	geboren am 4. Juni 1955 in Badenweiler, Kreis Mülheim Tochter von Prof. Dr. Dr. G. Ziegmayer und Eva-Marie Ziegmayer, geb. Saller
1961-1965	Grundschule in München
1965-1974	Elsa-Brandström-Gymnasium, München
Juni 1974	Abitur
1974-1981	Studium der Biologie an der Ludwigs-Maximilians-Universität, München
Oktober 1976	Diplom-Vorprüfung
1978-1979	Laborassistentz am Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Juli-September 1979	Laborassistentz am National Institute for Virology, Sandringham, Südafrika
Mai 1980	Diplom-Hauptprüfung
1981	Diplomarbeit am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München: "Anreicherung von Proteinen menschlicher Zellkern-Membranen durch Affinitätschromatographie an Ricinuslektin-Säulen und Überprüfung der DNA-bindenden Eigenschaften."
Dezember 1981	Diplom - Biologin
1982-1985	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München
1984	Heirat mit Dipl.-Betriebswirt U. Klösser
1982-1986	Promotion am Lehrstuhl für Anthropologie und Humangenetik der Universität München.

